

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



METABOLISMO DEL PEPTIDOGLICANO

DE *Salmonella* EN EL INTERIOR

DE CÉLULAS EUCARIOTAS

TESIS DOCTORAL

GADEA RICO PÉREZ

MADRID, 2015

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



METABOLISMO DEL PEPTIDOGLICANO

DE *Salmonella* EN EL INTERIOR

DE CÉLULAS EUCARIOTAS



Gadea Rico Pérez

Licenciada en Biología y Bioquímica

Directores: Dr. Francisco García del Portillo y

Dra. M^a Graciela Pucciarelli

Centro Nacional de Biotecnología, CNB-CSIC

El trabajo recogido en la presente memoria ha sido realizado por Gadea Rico Pérez bajo la dirección del Dr. Francisco García del Portillo y de la Dra. M^a Graciela Pucciarelli en el Laboratorio de Patogénesis Microbiana del Departamento de Biotecnología Microbiana perteneciente al Centro Nacional de Biotecnología, CNB-CSIC.

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) concedida por el Ministerio de Educación (AP2009-0273) y a los contratos asociados a los proyectos GEN2006-27776-C2-1-E/PAT, BIO2007-67457-C02-01, IPT-2012-0213-060000 y BIO2013-46281-P.

Opta al Grado de Doctor

V^oB^o Directores de Tesis

Gadea Rico Pérez

Francisco García del Portillo

M^a Graciela Pucciarelli

A Jairo

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, tengo que agradecer a mi director, el Dr. Francisco García del Portillo el haberme dado la oportunidad de realizar mi Tesis Doctoral en su grupo. Gracias Paco por confiar en mí y por apoyarme a lo largo de este camino.

Gracias también a mi codirectora y tutora, la Dra. Graciela Pucciarelli por estar siempre dispuesta a ayudarme con cualquiera de mis dudas.

Quiero agradecer también a los Drs. Miguel Ángel de Pedro, Juan Ayala y Alberto Paradela toda la ayuda experimental e intelectual que me han ofrecido.

No me puedo olvidar de todos mis compañeros, los primeros, los intermedios y los últimos. Gracias a Jesús, Javi, Natalia, Lorena, Laura B., Laura N., Ana, Virginia, Álvaro, Juanjo, Estel y Diana, porque juntos formamos un gran grupo de compañeros y, lo más importante, de amigos, y gracias por haberme acompañado en grandes momentos de mi vida. Gracias Jesús por ayudarme a dar los primeros pasos en un laboratorio, por enseñarme “grandes” conocimientos de Biología Molecular y, por supuesto, por la infinita paciencia que tuviste conmigo. Gracias Javi por estar siempre dispuesto a ayudarme, incluso desde la distancia, y por haberme recibido con los brazos abiertos durante mi estancia en Rosario, porque Jesi, Luanna y tú fuisteis la mejor “familia de acogida” que podía tener. Gracias Nat y Lorena por tener ese sentido del humor que nos alegraba el día. Gracias Laura B. por ser mi compañera de risas. Gracias Laura N. por ser una gran amiga al otro lado del charco. Gracias Ana por ayudarnos a abrir nuestros “corazones”, ¿qué haríamos hoy sin ellos? Vir, gracias por encargarte de mantenerme despierta cada día. Gracias Álvaro por darme respuestas perfectas a pesar de ser el tercero de la lista y

porque eres el mejor piropeador del mundo. Gracias Juanjo por poner el sentido común en toda esta tropa y por ser el impulsor de mis "baruyings". Gracias Estelcíta por ser mi apoyo hasta el final, por ser mi gran "compí" de poyata a pesar de tu organización (o des), por dejarme notitas que siempre me sacaban una sonrisa y por los grandes experimentos que hemos compartido. Gracias Dianina por ser una gran compañera, una gran amiga y, por supuesto mi técnico personal, sin tu ayuda no hubiera podido llegar hasta aquí, o por lo menos, no hubiera podido tener tantísimos mutantes construidos, sé que tengo que agradecerte el gran trabajo que has hecho con "mi peptidoglicano". Gracias Pablo por recoger el testigo de Diana ayudándome con mis mutantes y, por haber realizado junto a Graciela el experimento con ratones. Gracias a Alberto, Noe y Daniela por haber sido tan buenos compañeros durante la fase intermedia de mi Tesis y, especialmente, gracias Daniela por ayudarme con ensayos recogidos en este trabajo. Gracias Damían porque a pesar de ser un "extraño" en el 280 has sido un compañero más. Y gracias a Juanjo C., Rocío, Luis, Alberto y Sonia por aguantarme en el momento crítico de mi Tesis, la escritura. Gracias a todos porque habéis sido unos buenísimos compañeros durante esta etapa.

No me puedo olvidar de mi familia y amigos. Gracias Jairo por estar a mi lado y ser mi apoyo fundamental. Gracias a mis padres y mi hermano por animarme siempre dándome todo su cariño. A mis suegros y mi cuñado por disfrutar escuchando las historietas del 280. Al resto de la familia simplemente, gracias por estar ahí. Y a mis amigos, en especial a Dani, Gló y mi pequeña ahijada Celia, porque vuestra amistad siempre es un gran apoyo para mí.

RESUMEN

El peptidoglicano es un componente esencial de la pared celular que rodea por completo a la bacteria y de cuya integridad depende la viabilidad celular. Esta estructura es un heteropolímero formado por largas cadenas glucídicas entrecruzadas por cadenas peptídicas cortas. El peptidoglicano experimenta continuos procesos de remodelado que facilitan la adaptación de la bacteria a condiciones ambientales cambiantes. En estrecha correlación con los diversos enlaces existentes en el peptidoglicano, hoy se conocen una gran cantidad de enzimas implicadas en su metabolismo, a las que hemos dividido, en este trabajo, en cuatro grupos según su actividad: biosíntesis (BIO), modificación (MOD), hidrólisis (HID) y reciclaje (REC).

Salmonella enterica es un patógeno intracelular que causa infecciones en un amplio rango de hospedadores. En esta Tesis hemos empleado fibroblastos como modelo de línea celular. En este tipo celular *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) establece un estado de baja proliferación, similar al observado *in vivo* en bacteria que coloniza tejidos animales. Hemos identificado un total de cuarenta y ocho genes de *S. Typhimurium* cuyos productos podrían tener una actividad enzimática definida sobre el metabolismo del peptidoglicano. Dentro de estos genes, cinco de ellos, *STM1836*, *STM1910*, *STM1940*, *STM3277* y *STM4217*, se incluyeron en el estudio por estar presentes de forma diferencial en el género *Salmonella*. *STM1836* y *STM1910* muestran una identidad del 65 % con los genes *mrdA* y *ftsI*, los cuales codifican las proteínas PBP 2 y PBP 3, esenciales en la biosíntesis del peptidoglicano. Por otro lado, *STM1940* codifica una enzima con actividad DL-endopeptidasa. La producción de *STM1940* aumenta en bacteria intracelular obtenida de células eucariotas, es regulada por el sistema de dos componentes PhoP-PhoQ y es necesaria para la virulencia en un modelo de ratón.

Durante la infección de fibroblastos se han observado cambios en la maquinaria enzimática del peptidoglicano. Dentro de la célula infectada, *S. Typhimurium* aumenta la producción de YbiS e YnhG dentro del grupo de enzimas de biosíntesis; PBP 5, PBP 6, PBP 6B, PBP 7, Spr, NlpC y *STM1940* como enzimas de modificación; MltA y EmtA dentro de las enzimas de hidrólisis; y NagZ, LdcA y Mpl como enzimas de reciclaje.

La existencia de enzimas que reconocen un mismo enlace en el peptidoglicano ha dificultado la obtención de fenotipos en el modelo de infección de fibroblastos.

Se ha analizado además la estructura del peptidoglicano de *S. Typhimurium* obtenido de bacteria intracelular en estado no proliferativo. Este estudio concluyó con la identificación de un componente del peptidoglicano no descrito con anterioridad correspondiente a un muropéptido no entrecruzado que contiene, en la cuarta posición de la cadena peptídica lateral, una molécula de aminoalcohol (alaninol o 1-amino-2-propanol).

Esta Tesis describe, de forma completa, el conjunto de enzimas implicadas en el metabolismo del peptidoglicano de *S. Typhimurium*, centrándose en su regulación en el ambiente extracelular e intracelular además de su contribución a la infección. Información adicional aportada en este trabajo incluye la definición de la estructura del peptidoglicano en bacteria intracelular obtenida de fibroblastos, además del estudio y actividad de la enzima *STM1940*, codificada en una isla genómica exclusiva del género *Salmonella*.

SUMMARY

Peptidoglycan is an essential component of the cell wall that surrounds the bacteria completely and whose integrity ensures bacterial viability against internal osmotic pressure. This structure is a heteropolymer formed by long glycan chains cross-linked by short stem peptide chains. The peptidoglycan is continuously remodeled what facilitates bacterial adaptation to changing environmental conditions. In close relationship to the diversity of bonds known to be present in the peptidoglycan, a large number of enzymes are also involved in its metabolism, which we divided in four groups in this work: biosynthesis (BIO), modification (MOD), hydrolysis (HID) and recycling (REC).

Salmonella enterica is an intracellular pathogen that causes infections in a broad range of hosts. In this Thesis, we used fibroblasts as cell line model, since *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) adapts in this cell type to a non-proliferative stage, similar to that observed when bacteria colonize host tissues *in vivo*. We have identified forty eight genes of *S. Typhimurium* whose products are predicted to have a well-defined enzymatic activity on the peptidoglycan metabolism. Five of these genes, *STM1836*, *STM1910*, *STM1940*, *STM3277* and *STM4217*, were included in this investigation because they are present almost exclusively in the *Salmonella* genus. *STM1836* and *STM1910* exhibit 65 % identity at the amino acid level with the products of *mrdA* and *ftsI*, genes that encode PBP 2 and PBP 3, essential biosynthetic proteins involved in the elongation and division phases, respectively. On the other hand, *STM1940* encodes an enzyme with DL-endopeptidase activity. The production of *STM1940* increase in intracellular bacteria obtained from eukaryotic cells, it is regulated by the two component system PhoP-PhoQ and it is necessary for virulence in the mouse model.

During fibroblast infection we have observed changes in the enzymatic machinery of the peptidoglycan. Inside the infected cell, *S. Typhimurium* increases the production of: the biosynthetic enzymes YbiS and YnhG; the modification enzymes PBP 5, PBP 6, PBP 6B, PBP 7, Spr, NlpC and *STM1940*; MltA and EmtA as hydrolytic enzymes; and, NagZ, LdcA and Mpl as recycling enzymes.

The redundancy of enzymes acting over the same bond of the peptidoglycan has complicated the identification of phenotypes in the fibroblast infection model.

We have also analyzed the structure of the peptidoglycan of *S. Typhimurium* obtained from intracellular bacteria in a non-proliferative state. This study led to the identification of a new component of its peptidoglycan that corresponds to a non-cross-linked muropeptide that contains an aminoalcohol molecule (alaninol or 1-amino-2-propanol) in the fourth position of the peptide chain.

Therefore, this Thesis describes in a comprehensive manner, the enzymatic machinery involved in the peptidoglycan metabolism of *S. Typhimurium*. This study was focused on aspects related to peptidoglycan regulation in bacteria adapting to extracellular and intracellular environments as well as its contribution to the infection. This work also includes the definition of the peptidoglycan structure of non-growing bacteria inside fibroblasts and, in addition, the characterization of a novel DL-endopeptidase, *STM1940*, encoded in a genomic island exclusive of the *Salmonella* genus.

ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS	v
LISTADO DE TABLAS	viii
LISTADO DE TABLAS ANEXO I	ix
LISTADO DE FIGURAS ANEXO I	x
CLAVE DE ABREVIATURAS	xi
INTRODUCCIÓN	1
A. El género <i>Salmonella</i>	3
A.1 Taxonomía	3
A.2 Interacción de <i>Salmonella</i> con el hospedador en modelos de ratón	4
A.3 Interacción de <i>Salmonella</i> con distintos tipos celulares	4
A.3.1 Comportamiento de <i>Salmonella</i> en el interior de células epiteliales	5
A.3.2 Comportamiento de <i>Salmonella</i> en el interior de células fagocíticas	5
A.3.3 Comportamiento de <i>Salmonella</i> en el interior de fibroblastos	6
B. El peptidoglicano	7
B.1 Metabolismo del peptidoglicano	11
B.1.1 Biosíntesis del peptidoglicano	11
B.1.2 Modificación e hidrólisis del peptidoglicano	14
B.1.3 Reciclaje del peptidoglicano	17
B.2 Modos de crecimiento y regulación de la biosíntesis del peptidoglicano	18
B.3 Inhibidores de la biosíntesis del peptidoglicano	19
B.4 Papel del peptidoglicano en el reconocimiento de la infección por el sistema de defensa innato de la célula eucariota	21
B.5 El peptidoglicano en otras bacterias que producen infección intracelular	22
OBJETIVOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	29
A. Material biológico	31
A.1 Estirpes bacterianas y plásmidos	31
A.2 Bacteriófagos	31
A.3 Anticuerpos	31
A.4 Líneas celulares eucariotas	31
B. Medios y condiciones de cultivo	31
B.1 Cultivo de bacterias	31
B.2 Cultivo de células eucariotas	33
C. Genética bacteriana	33
C.1 Inactivación de genes cromosómicos de <i>S. Typhimurium</i> SV5015	33
C.2 Etiquetado de genes cromosómicos de <i>S. Typhimurium</i> SV5015	34

C.3 Etiquetado de genes cromosómicos basado en la utilización del plásmido pKO3 Blue ...	34
C.4 Electroporación de ácidos nucleicos en <i>S. Typhimurium</i> y <i>E. coli</i>	34
C.5 Preparación de lisados de bacteriófagos P22	35
C.6 Transducción en medio líquido	35
D. Manipulación de ácidos nucleicos	35
D.1 Extracción de DNA genómico	35
D.2 Extracción de DNA plasmídico	35
D.3 Extracción de RNA.....	36
D.4 Digestión y ligación de fragmentos de DNA	36
D.5 Clonación de genes de <i>S. Typhimurium</i> SV5015.....	36
D.6 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.....	36
D.7 Aislamiento de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa	36
D.8 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	36
D.9 Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa (RT-PCR).....	37
E. Secuenciación	37
E.1 Secuenciación de DNA	37
E.2 Análisis y comparación de secuencias	37
F. Microscopía	37
F.1 Tapizado de lentillas con Poli-L-Lisina	37
F.2 Fijación de las bacterias de medio de cultivo.....	37
G. Infección de cultivos celulares con <i>S. Typhimurium</i>	38
G.1 Determinación de la tasa de invasión e índice de proliferación intracelular	38
G.2 Obtención de bacteria intracelular en ensayos de infección de células eucariotas	38
H. Modelo de infección <i>in vivo</i>	39
H.1 Ensayo de índice de competición en ratones BALB/c.....	39
I. Preparación de extractos de proteínas	40
I.1 Proteínas totales de <i>S. Typhimurium</i> crecida en medios de cultivo	40
I.2 Proteínas totales de <i>Salmonella</i> intracelular	40
I.3 Fraccionamiento de extracto de bacterias	40
J. Inmunodetección de proteínas (ensayos de “Western”)	41
K. Purificación de proteínas.....	41
K.1 Producción de las proteínas STM1940::6xHis, PBP 2::6xHis y PBP 3::6xHis desde plásmido	41
K.2 Purificación de STM1940::6xHis mediante columna de afinidad	41
K.3 Actividad de la proteína STM1940::6xHis sobre muropéptidos purificados y sobre peptidoglicano total.....	42
L. Análisis estructural del peptidoglicano	42
L.1 Purificación de peptidoglicano de <i>S. Typhimurium</i> crecida en medios de cultivo.....	42
L.2 Purificación de peptidoglicano de <i>S. Typhimurium</i> intracelular.....	43

L.3 Obtención de muropéptidos para análisis cromatográfico.....	43
L.4 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	43
L.5 Cálculo del grado de entrecruzamiento y de la longitud de cadena de la estructura del peptidoglicano	44
M. Anticuerpos.....	44
M.1 Producción de anticuerpos en conejo	44
M.2 Purificación de los sueros de conejo.....	45
N. Análisis estadístico	45
RESULTADOS	47
CAPÍTULO 1	49
Análisis <i>in silico</i> de la maquinaria enzimática empleada en la biosíntesis, modificación, hidrólisis y reciclaje del peptidoglicano de <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	49
1.1 Clasificación de proteínas con posible actividad enzimática sobre el peptidoglicano de <i>S. Typhimurium</i>	51
1.2 Proteínas específicas de <i>S. Typhimurium</i> con posible actividad sobre el peptidoglicano. 53	
CAPÍTULO 2	59
Perfil de expresión de proteínas de <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium con posible actividad en el metabolismo del peptidoglicano	59
2.1 Etiquetado de genes de <i>S. Typhimurium</i> que codifican enzimas con actividad en el peptidoglicano	61
2.2 Expresión en el ambiente extracelular e intracelular de proteínas de <i>S. Typhimurium</i> con actividad sobre el peptidoglicano	63
2.2.1 Producción de enzimas de biosíntesis del peptidoglicano (BIO) en <i>S. Typhimurium</i> extracelular e intracelular	64
2.2.2 Producción de enzimas de modificación del peptidoglicano (MOD) en <i>S. Typhimurium</i> extracelular e intracelular	66
2.2.3 Producción de enzimas de hidrólisis del peptidoglicano (HID) en <i>S. Typhimurium</i> extracelular e intracelular	68
2.2.4 Producción de enzimas de reciclaje del peptidoglicano (REC) en <i>S. Typhimurium</i> extracelular e intracelular	70
CAPÍTULO 3	73
Estudio funcional de las enzimas del metabolismo del peptidoglicano en la infección de células eucariotas por <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	73
3.1 Comportamiento en infección de mutantes sencillos de <i>S. Typhimurium</i> con deficiencias en enzimas del metabolismo del peptidoglicano.....	75
3.2 Comportamiento en infección de mutantes múltiples de <i>S. Typhimurium</i> con deficiencia simultánea en varias enzimas del metabolismo del peptidoglicano	77
3.2.1 Ensayos en mutantes múltiples carentes de enzimas con la misma actividad sobre el metabolismo del peptidoglicano	78
3.2.2 Ensayos de mutantes múltiples carentes de enzimas del metabolismo del peptidoglicano abundantes en <i>S. Typhimurium</i> intracelular	94
CAPÍTULO 4	99
Estructura del peptidoglicano de <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium.....	99

4.1 Estructura del peptidoglicano de estirpes mutantes en enzimas del peptidoglicano.....	101
4.2 Estructura del peptidoglicano de <i>S. Typhimurium</i> SV5015 en bacteria intracelular	103
CAPÍTULO 5	121
Estudio funcional de la enzima del peptidoglicano STM1940, inducida por <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium en el interior de células eucariotas	121
5.1 STM1940 mapea en una isla genómica de <i>S. Typhimurium</i> que está ausente en <i>E. coli</i>	123
5.2 Regulación en la producción de la proteína STM1940	125
5.3 La producción de STM1940 está controlada por los sistemas de dos componentes PhoP-PhoQ y OmpR-EnvZ, además de por el regulador SlyA.....	126
5.4 Determinación de la actividad enzimática de STM1940	128
5.4.1 Purificación de STM1940	128
5.4.2 Ensayos de actividad enzimática de la proteína STM1940	128
5.5 Contribución de STM1940 en la virulencia de <i>S. Typhimurium</i>	131
DISCUSIÓN	133
CONCLUSIONES	151
BIBLIOGRAFÍA	157
ANEXO I	171
Tablas de estirpes, plásmidos y oligonucleótidos	173
Figuras suplementarias	191
ANEXO II	207
Artículos publicados	209

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Composición de la envoltura de bacterias Gram negativas.....	7
Figura 2. Estructura del peptidoglicano de bacterias Gram negativas como <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella enterica</i>	9
Figura 3. Muropéptidos más abundantes del peptidoglicano de <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella enterica</i>	9
Figura 4. Rutas metabólicas del peptidoglicano caracterizadas en <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella enterica</i>	10
Figura 5. Enzimas implicadas en rutas de biosíntesis (BIO) del peptidoglicano	13
Figura 6. Enzimas implicadas en reacciones de modificación (MOD) e hidrólisis (HID) del peptidoglicano	15
Figura 7. Enzimas que intervienen en las rutas de reciclaje (REC) del peptidoglicano.....	18
Figura 8. Estructura de los muropéptidos M3 y MDP, activadores de los receptores Nod.....	22
Figura 9. Dominios funcionales de las proteínas de <i>S. Typhimurium</i> asignadas al grupo de enzimas de biosíntesis (BIO) del peptidoglicano	53
Figura 10A. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de PBP 3* (STM1836) con PBP3 (FtsI) de <i>S. Typhimurium</i> SL1344.....	54
Figura 10B. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de PBP 2* (STM1910) con PBP2 (MrdA) de <i>S. Typhimurium</i> SL1344.....	55
Figura 11. Distribución de los genes <i>mrdA</i> (<i>pbp 2</i>), <i>STM1910</i> (<i>pbp 2*</i>), <i>ftsI</i> (<i>pbp 3</i>), <i>STM1836</i> (<i>pbp 3*</i>), <i>STM3277</i> y <i>STM4217</i> dentro del género <i>Salmonella</i>	56
Figura 12. Dominios funcionales de las proteínas de <i>S. Typhimurium</i> asignadas al grupo de modificación (MOD) del peptidoglicano	57
Figura 13. Dominios funcionales de las proteínas de <i>S. Typhimurium</i> asignadas al grupo de hidrólisis (HID) del peptidoglicano.....	57
Figura 14. Movilidad electroforética de las distintas enzimas de <i>S. Typhimurium</i> que fueron etiquetadas y combinadas genéticamente en las estirpes “multi-etiqueta”	62
Figura 15. Secuencia de manipulaciones genéticas en <i>S. Typhimurium</i> que derivan en la construcción de la estirpe “multi-etiqueta” 3 (<i>mepA::3xFLAG dacD::3xFLAG mltF::3xFLAG mltB::3xFLAG-kan</i>).....	63
Figura 16. Expresión en el ambiente extracelular e intracelular de las proteínas de <i>S. Typhimurium</i> implicadas en la biosíntesis del peptidoglicano (BIO).....	65
Figura 17. Expresión en el ambiente extracelular e intracelular de las proteínas de <i>S. Typhimurium</i> implicadas en la modificación del peptidoglicano (MOD)	67
Figura 18. Expresión en el ambiente extracelular e intracelular de las proteínas de <i>S. Typhimurium</i> implicadas en la hidrólisis del peptidoglicano (HID).....	69
Figura 19. Expresión en el ambiente extracelular e intracelular de las proteínas de <i>S. Typhimurium</i> implicadas en el reciclaje del peptidoglicano (REC).	70

Figura 20. Prueba mediante RT-PCR de posibles efectos polares sobre la expresión de genes adyacentes al gen implicado en el metabolismo del peptidoglicano	77
Figura 21. Estimación mediante el ensayo de "gota" de las tasas de invasión y crecimiento intracelular en fibroblastos de rata NRK-49F de mutantes múltiples de <i>S. Typhimurium</i> deficientes en enzimas de biosíntesis (BIO) del peptidoglicano	80
Figura 22. El triple mutante $\Delta mrcB \Delta STM1836::kan \Delta STM1910::cat$ de <i>S. Typhimurium</i> presenta una tasa de proliferación intracelular reducida en fibroblastos NRK-49	81
Figura 23. Morfología de los mutantes múltiples de <i>S. Typhimurium</i> con deficiencias en enzimas implicadas en la biosíntesis (BIO) del peptidoglicano.....	82
Figura 24. El mutante múltiple $\Delta erfK \Delta ybiS \Delta ycbB \Delta ycfS \Delta ynhG \Delta yafK \Delta STM3277::kan$ presenta una menor tasa de invasión mientras que la tasa de proliferación intracelular en fibroblastos NRK-49F está aumentada.....	83
Figura 25. Estimación mediante el ensayo de "gota" de las tasas de invasión y crecimiento intracelular en fibroblastos de rata NRK-49F de mutantes múltiples de <i>S. Typhimurium</i> deficientes en enzimas de modificación (MOD) del peptidoglicano	84
Figura 26. Ensayo de "gota", tasas de invasión y crecimiento intracelular en fibroblastos de rata NRK-49F y, morfología del mutante de <i>S. Typhimurium</i> $\Delta STM1940::kan$	85
Figura 27. Morfología de los mutantes múltiples de <i>S. Typhimurium</i> con deficiencias en enzimas implicadas en la modificación (MOD) del peptidoglicano.....	86
Figura 28. Estimación mediante el ensayo de "gota" de las tasas de invasión y crecimiento intracelular en fibroblastos de rata NRK-49F de mutantes múltiples de <i>S. Typhimurium</i> deficientes en enzimas de hidrólisis (HID) del peptidoglicano	87
Figura 29. Morfología de los mutantes múltiples de <i>S. Typhimurium</i> con deficiencias en enzimas de hidrólisis (HID) del peptidoglicano.....	88
Figura 30. Tasas de invasión y proliferación intracelular en fibroblastos NRK-49F de mutantes múltiples de <i>S. Typhimurium</i> en genes que codifican transglicosilasas líticas (TLs).....	89
Figura 31. Morfología de los mutantes múltiples de <i>S. Typhimurium</i> deficientes en enzimas con actividad amidasas (Ami) sobre el peptidoglicano	90
Figura 32. Estimación mediante el ensayo de "gota" de las tasas de invasión y crecimiento intracelular en fibroblastos de rata NRK-49F de mutantes múltiples de <i>S. Typhimurium</i> deficientes en enzimas con actividad amidasa (Ami).....	91
Figura 33. Tasas de invasión y proliferación intracelular en fibroblastos NRK-49F de mutantes múltiples de <i>S. Typhimurium</i> en genes que codifican amidasas (Ami).....	92
Figura 34. Ensayo de "gota", tasas de invasión y crecimiento intracelular en fibroblastos de rata NRK-49F y, morfología del mutante de <i>S. Typhimurium</i> deficiente en enzimas del reciclaje (REC) del peptidoglicano.....	93
Figura 35. Estimación mediante el ensayo de "gota" de las tasas de invasión y crecimiento intracelular en fibroblastos de rata NRK-49F de mutantes múltiples de <i>S. Typhimurium</i> deficientes en enzimas producidas a altos niveles por bacteria intracelular.....	95
Figura 36. Morfología de los mutantes múltiples de <i>S. Typhimurium</i> deficientes en enzimas producidas a altos niveles por bacteria intracelular	96

Figura 37. Estructura química de los muropéptidos identificados por HPLC en el peptidoglicano de bacteria crecida en medio LB (inóculo).....	105
Figura 38. Perfil de muropéptidos del peptidoglicano de <i>S. Typhimurium</i> SV5015 en muestras obtenidas de bacteria extracelular e intracelular.....	106
Figura 39. Perfil de muropéptidos del peptidoglicano de la estirpe <i>phoP7953::Tn10</i> en bacteria intracelular obtenida de fibroblastos BJ-5ta.....	108
Figura 40. Estructura química de los muropéptidos identificados por HPLC en el peptidoglicano de bacteria intracelular obtenida de fibroblastos BJ-5ta.....	110
Figura 41. Tiempo de retención cromatográfico de M3G y B/B'.....	112
Figura 42. Espectro de masas (MS) de M3G y B/B' obtenido por ESI-QTOF.....	113
Figura 43. Espectros de fragmentación MSMS obtenidos por ESI-QTOF correspondientes a los muropéptidos M3G y B/B'.....	114
Figura 44. Posibles aminoalcoholes presentes en el muropéptido B/B' específico de bacteria intracelular.....	115
Figura 45. Posible estructura del muropéptido B/B'.....	115
Figura 46. Espectro de fragmentación de los muropéptidos M3G y B/B' marcados con ICPL....	116
Figura 47. Ausencia de incorporación de D/L-alaninol/1-amino-2-propanol en el sáculo de <i>Vibrio cholerae</i> incubado en presencia de LdtA.....	118
Figura 48. Incorporación de D-Met en el sáculo de <i>Vibrio cholerae</i> por la actividad de LdtA.....	119
Figura 49. Distribución de los genes <i>STM1939</i> , <i>STM1940</i> y <i>STM1941</i> en distintas especies y serovares del género <i>Salmonella</i> y en <i>E. coli</i> K-12 MG1655.....	124
Figura 50. <i>STM1940</i> mapea en una isla genómica de <i>Salmonella</i> que está ausente en la mayoría de estirpes de <i>E. coli</i>	124
Figura 51. Producción de <i>STM1940</i> por <i>S. Typhimurium</i> en distintos medios de cultivo y en el interior de células eucariotas.....	125
Figura 52. Efecto de las mutaciones <i>phoP</i> , <i>ompR</i> y <i>slyA</i> y de una alta concentración de Mg^{2+} en la producción de <i>STM1939</i> , <i>STM1940</i> y <i>STM1941</i> por <i>S. Typhimurium</i>	127
Figura 53. Localización subcelular de <i>STM1940</i> en <i>S. Typhimurium</i>	128
Figura 54. Producción de <i>STM1940::6xHis</i> sin el péptido señal.....	129
Figura 55. <i>STM1940</i> muestra actividad DL-endopeptidasa/DL-carboxipeptidasa sobre muropéptidos no entrecruzados.....	130
Figura 56. <i>STM1940</i> contribuye a la virulencia de <i>S. Typhimurium</i> en ratones BALB/c.....	131

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de proteínas de <i>S. Typhimurium</i> con posible actividad enzimática sobre el peptidoglicano	52
Tabla 2. Estirpes “multi-etiqueta” de <i>S. Typhimurium</i> construidas en este trabajo	61
Tabla 3. Mutantes sencillos de <i>S. Typhimurium</i> , con deficiencia en genes que codifican enzimas del metabolismo del peptidoglicano y usados en ensayos de infección.....	76
Tabla 4. Colección de mutantes múltiples de <i>S. Typhimurium</i> con deficiencia simultánea en genes que codifican enzimas del peptidoglicano con la misma actividad metabólica.....	79
Tabla 5. Estirpes de <i>S. Typhimurium</i> con deficiencias en una o varias amidasas (Ami)	88
Tabla 6. Colección de mutantes múltiples de <i>S. Typhimurium</i> con deficiencia simultánea en genes que codifican enzimas del peptidoglicano con altos niveles de producción en bacteria intracelular	94
Tabla 7. Grado de entrecruzamiento del peptidoglicano de varios mutantes de <i>S. Typhimurium</i> carentes de enzimas implicadas en el metabolismo del peptidoglicano.....	102
Tabla 8. Contenido de muropéptidos identificados por HPLC en dos muestras de la estirpe parental <i>S. Typhimurium</i> SV5015 obtenidas en experimentos independientes	103
Tabla 9A. Relaciones masa/carga (m/z) de los productos obtenidos tras la fragmentación de los muropéptidos M3G y B/B´	104
Tabla 9B. Relaciones masa/carga (m/z) de los productos obtenidos tras la fragmentación de los muropéptidos M3G y B/B´ marcados con ICPL	105
Tabla 10. Monómeros y dímeros empleados para el estudio de la actividad de STM1940.....	129

LISTADO DE TABLAS ANEXO I

Tabla A1. Estirpes de *S. Typhimurium* con distinto fondo genético empleadas en este trabajo ...173

Tabla A2. Estirpes de *E. coli* empleadas en este trabajo173

Tabla A3. Plásmidos empleados en este trabajo173

Tabla A4. Oligonucleótidos empleados para la delección de genes cromosómicos de *S. Typhimurium* SV5015 por el método de Datsenko y Wanner173

Tabla A5. Oligonucleótidos empleados para la confirmación de construcciones genéticas implicando delección o etiquetado de genes cromosómicos de *S. Typhimurium* SV5015175

Tabla A6. Oligonucleótidos empleados en el análisis de un posible efecto polar en genes adyacentes ligado a delecciones de genes cromosómicos de *S. Typhimurium* SV5015, así como para la confirmación de construcciones genéticas implicando delección o etiquetado.....176

Tabla A7. Oligonucleótidos empleados para el etiquetado de genes cromosómicos de *S. Typhimurium* SV5015181

Tabla A8. Oligonucleótidos empleados para el clonaje de genes cromosómicos de *S. Typhimurium* SV5015.....184

Tabla A9. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de DNA desde plásmido.....184

Tabla A10. Estirpes de *S. enterica* serovar Typhimurium etiquetadas en este trabajo184

Tabla A11. Estirpes de *S. enterica* serovar Typhimurium portando mutaciones en genes relacionados con el metabolismo del peptidoglicano.....186

LISTADO DE FIGURAS ANEXO I

Figura A1a. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de PBP 3 (FtsI) de *S. Typhimurium* SL1344 con PBP3 (FtsI) de *E.coli* K-12 MG1655 191

Figura A1b. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de PBP 2 (MrdA) de *S. Typhimurium* SL1344 con PBP2 (MrdA) de *E.coli* K-12 MG1655..... 192

Figura A2. Tasas de proliferación intracelular en fibroblastos BJ-5ta de mutantes sencillos de *S. enterica* serovar Typhimurium en genes con actividad sobre el metabolismo del peptidoglicano.193

Figura A3. Comparativa del perfil de muropéptidos en el peptidoglicano de las estirpes SV5015 y *phoP7953::Tn10* correspondientes a bacteria intracelular aislada de fibroblastos BJ-5ta 195

Figura A4a. Espectros completos de fragmentación MSMS obtenidos por ESI-QTOF y correspondientes a los muropéptidos M3G y B/B' 197

Figura A4b. Espectros completos de fragmentación MSMS obtenidos por ESI-QTOF y correspondientes a los muropéptidos M3G y B/B' 199

Figura A5. Espectros completos de fragmentación de los muropéptidos M3G y B/B' incubados con ICPL..... 201

Figura A6. Posible estructura del muropéptido B/B' marcado con ICPL 202

Figura A7. Localización subcelular de STM1940 en *S. enterica* serovar Typhimurium.. 202

Figura A8. Distribución filogenética “fuera” del género *Salmonella* de ortólogos de STM1939, STM1940 y STM1941 de *S. enterica* serovar Typhimurium 203

Figura A9. Ausencia de actividad DL-endopeptidasa/DL-carboxipeptidasa de la proteína purificada STM1940 sobre peptidoglicano macromolecular. 204

CLAVE DE ABREVIATURAS

Ami: amidasa

BIO: etapa de biosíntesis del peptidoglicano

cat: gen de resistencia a cloranfenicol

Cys: cisteína

Cit: citoplasma

CPasa: carboxipeptidasa

D44: muropéptido entrecruzado dimérico con dos tetrapéptidos unidos mediante enlace DD

D34: muropéptido entrecruzado dimérico con un tripéptido y un tetrapéptido unidos mediante enlace DD

D43D: muropéptido entrecruzado dimérico con un tetrapéptido y un tripéptido unidos mediante enlace LD

D44D: muropéptido entrecruzado dimérico con dos tetrapéptidos unidos mediante enlace LD

D-Ala: D-alanina

DD: enlaces entre dos aminoácidos en su isoforma D

D-Glu: D del ácido glutámico

D-Met: D-metionina

DL: enlaces entre dos aminoácidos, el donador en su isoforma D y el receptor en su isoforma L

DMEM: medio de Eagle modificado por Dulbecco

DNAg: DNA genómico

DO₆₀₀: densidad óptica a 600 nm de longitud de onda

EPasa: endopeptidasa

ESI-QTOF: ESI- "*Electrospray Ionization*", QTOF- "*Quadrupole-Time-Of-Flight mass spectrometer*"

FLAG: epítipo 3xFLAG

Gly: glicina

HID: etapa de hidrólisis del peptidoglicano

HMW: PBP de alto peso molecular ("*High Molecular Weight*")

hpi: horas post-infección

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución ("*High Performance Liquid Chromatography*")

IC: índice de competición

iE-Dap: dipéptido D-Glu-*m*-Dap

i.p: inoculación intraperitoneal

Ipro: índice de proliferación

ISM: medio mínimo de cultivo ("Intracellular Salts Medium")

kan: gen de resistencia a kanamicina

kb: kilobases

L-Ala: L-alanina

L-Arg: L-arginina

L-Lys: L-lisina

LB: medio de cultivo Luria y Bertani

LD: enlaces entre dos aminoácidos, el donador en su isoforma L y el receptor en su isoforma D

LMW: PBPs de bajo peso molecular ("Low Molecular Weight")

Lpp: lipoproteína de Braun

LPS: lipopolisacárido

M3: muropéptido monomérico tripeptídico

M3G: muropéptido monomérico tetrapeptídico con una glicina en la cuarta posición

M4: muropéptido monomérico tetrapeptídico

M5: muropéptido monomérico pentapeptídico

m-DAP: ácido *meso*-diaminopimélico

Mb: megabases

MDP: muramil dipéptido

M.E: membrana externa

MEM: medio mínimo de Eagle

M.I: membrana interna

MOD: etapa de modificación del peptidoglicano

NAcGlc: N-acetilglucosamina

NAcMur: ácido N-acetilmurámico

NCDAA: D-aminoácidos no canónicos ("Non- Canonical D-Amino Aacids")

Nod: dominio de oligomerización nucleotídico ("Nucleotide oligomerization domain")

NRK-49F: fibroblastos de riñón de rata ("Normal Rat Kidney Fibroblasts")

PBP: proteína de unión a Penicilina ("Penicillin-Binding Protein")

PBS: solución tamponada fosfato salina

PCN: medio mínimo de cultivo que contiene fosfato, carbono y nitrógeno ("Phosphate-Carbon-Nitrogen")

PCR: reacción en cadena de la polimerasa ("Polymerase Chain Reaction")

pi: post-infección

PS: péptido señal

REC: etapa de reciclaje del peptidoglicano

RT-PCR: PCR con transcriptasa reversa ("Retrotranscriptase-Polymerase Chain Reaction")

SCV: vacuola que contiene a *Salmonella* ("Salmonella-Containing Vacuole")

Ser: serina

SFB: suero fetal bovino

SPI: isla de patogenicidad de *Salmonella* ("Salmonella Pathogenicity Island")

sRNAs: RNAs pequeños ("small RNAs")

SST3: sistemas de secreción tipo 3

Ta: temperatura ambiente

TG: transglicosilasa

TL: transglicosilasa lítica

TM: región transmembrana

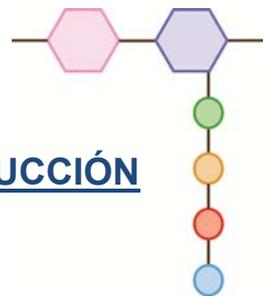
TP: transpeptidasa

UDP-NAcGlc: difosfato de uridina-N-acetilglucosamina

UDP-NAcMur: difosfato de uridina-ácido-N-acetilmurámico

ufc: unidad formadora de colonia

INTRODUCCIÓN



A. El género *Salmonella*

A.1 Taxonomía

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y está filogenéticamente próximo a los géneros *Escherichia*, *Shigella* y *Citrobacter*. Este género comprende bacterias Gram negativas, móviles, anaerobias facultativas y no formadoras de esporas que infectan un gran número de animales como mamíferos, reptiles, pájaros e insectos (Winfield & Groisman, 2003). Su hábitat principal es el tracto gastrointestinal de animales infectados, localizándose también en el agua y el suelo, donde persisten largos periodos de tiempo.

La nomenclatura del género *Salmonella* ha sufrido cambios reconociéndose actualmente dos especies: *S. enterica* y *S. bongori* (Tindall *et al.*, 2005). *S. enterica* comprende seis subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI). Hasta el momento se han caracterizado más de 2.550 serovares clasificados en base a los antígenos somático O y flagelar H (Grimont & Weill, 2007).

El cromosoma de las bacterias del género *Salmonella* tiene un tamaño promedio de 4,8 megabases (Mb). En el caso concreto de la estirpe SL1344 de *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*), utilizada como referencia en modelos de infección, su genoma comprende 4.878 kilobases (kb) con 4.742 genes codificantes, de los cuales 212 están codificados en tres plásmidos: pSLT, pCol1B9 (p2) y pRSF1010. pSLT es el plásmido de virulencia con un tamaño de 94 kb (Kröger *et al.*, 2012). Tanto el cromosoma como el plásmido pSLT, codifican factores de virulencia necesarios para la colonización y supervivencia del patógeno en el hospedador (McGhie *et al.*, 2009; Rotger & Casadesús, 1999). Algunos de estos factores están codificados en "islas de patogenicidad" (SPI, "*Salmonella Pathogenicity Island*") de las que el género *Salmonella* presenta diecisiete (Gerlach & Hensel, 2007). La adquisición de SPIs por los diferentes serovares de *S. enterica* se ha asociado a eventos de transferencia genética horizontal (Kelly *et al.*, 2009; Gerlach & Hensel, 2007; Hensel, 2004). La estirpe de *S. Typhimurium* SL1344 expresa además, alrededor de 140 RNAs pequeños (sRNAs-"*small RNAs*"), moléculas de menos de 500 nucleótidos para las que, en muchos casos, se ha demostrado actividad reguladora (Padalon-Brauch *et al.*, 2008).

Más del 99 % de los aislados de *Salmonella* responsables de las enfermedades causadas en animales homeotermos, incluido el hombre, pertenecen a la subespecie I de *S. enterica*. El 1 % restante engloba el resto de subespecies de *S. enterica* y la especie *S. bongori*, cuyo aislamiento es más común en animales poiquilotermos y en el medio ambiente (Bäumler, 1997). Ciertos serotipos de la subespecie I de *S. enterica* muestran un rango diverso de hospedador y producen enfermedades con distinta gravedad. Por ejemplo, el serovar Typhi presenta un rango de hospedador muy limitado y causa infecciones sistémicas graves exclusivamente en humanos y primates superiores. Por el contrario, los serovares Enteritidis y Typhimurium presentan un rango de hospedador más amplio y provocan enfermedades gastrointestinales manteniendo su capacidad de producir infecciones sistémicas (Chan, *et al.*, 2003; Bäumler, 1997). Las enfermedades más frecuentes en el hombre, como consecuencia de la infección por *Salmonella*, son enterocolitis y fiebre (Bäumler *et al.*, 2011). Estas enfermedades se adquieren al consumir alimentos mal cocinados o por la ingesta de frutas y verduras frescas tratadas con aguas fecales. Además, una fuente importante de contaminación son los reptiles (Winfield & Groisman, 2003).

Una característica de las infecciones por *Salmonella* es su capacidad de adherirse e invadir las células epiteliales del intestino. En el caso del serovar Typhimurium, el más estudiado, la bacteria atraviesa las células M (por “micropliegues”) que se localizan en las placas de Peyer de la región terminal del intestino delgado. Con posterioridad, la bacteria es fagocitada por los macrófagos para más tarde invadir órganos internos como el hígado y el bazo. La invasión de células eucariotas por *S. Typhimurium* induce una remodelación del citoesqueleto acompañada por la formación de ondulaciones en la membrana en forma de pseudópodos. Estos pseudópodos rodean y engullen a la bacteria (fenómeno denominado “*ruffling*”), lo que permite la colonización del nicho intracelular. Una de las mayores complicaciones de la infección por el serovar Typhimurium es el “choque séptico”, el cual es desencadenado, en parte, por el lipopolisacárido y la lipoproteína de Braun (Lpp), productos bacterianos que inducen la expresión de citoquinas proinflamatorias (Sha *et al.*, 2004). En el caso del serovar Typhi, una de las claves para su patogenicidad es su capacidad de establecer un estado de persistencia en el hospedador. Los pacientes pasan a ser portadores asintomáticos durante periodos que van desde un año a toda la vida (Monack, 2013; Thompson *et al.*, 2009). La identificación y tratamiento de estos individuos es crucial para el control de la enfermedad.

A.2 Interacción de *Salmonella* con el hospedador en modelos de ratón

El modelo animal de ratón es el más empleado en el estudio de la interacción patógeno-hospedador *in vivo* (Grassl & Finlay, 2008). El modelo más usado es el del serovar Typhimurium en ratones BALB/c (*Slc11a1*^{-/-}), ya que reproduce una sintomatología parecida a la fiebre tifoidea producida por el serovar Typhi en humanos (Santos *et al.*, 2001). Dentro de las líneas de ratones existe también variabilidad. Su susceptibilidad a la infección viene determinada por varios factores, incluyendo el estado funcional de *Slc11a1*, también conocida como *Nramp1* (“*Natural resistance-associated macrophage protein 1*”) (Vidal *et al.*, 1995), proteína implicada en el transporte de cationes desde el fagosoma al citoplasma. Asimismo, se ha observado que el pre-tratamiento de ratones C57BL/6 (*Slc11a1*^{+/+}) con estreptomycin causa inflamación intestinal crónica, fibrosis intestinal y diarrea, signos similares a los de la gastroenteritis producida en humanos por *S. Typhimurium* (Grassl *et al.*, 2008; Stecher *et al.*, 2006).

Una característica observada en los tejidos de ratón infectados por *S. Typhimurium* es el reducido número de bacterias intracelulares que se observa (un promedio de tres-cuatro bacterias por célula) (Thöne *et al.*, 2007; Monack *et al.*, 2004). Al microscopio, las bacterias se observan en focos de infección independientes que aumentan en número y tamaño a lo largo del proceso infeccioso (Lam & Monack, 2014; Mastroeni & Grant, 2013). Además, se ha observado que en la lámina propia de ratones infectados, *S. Typhimurium* infecta células CD18 negativas/CD45 negativas que podrían ser fibroblastos (Núñez-Hernández *et al.*, 2013).

A.3 Interacción de *Salmonella* con distintos tipos celulares

El modelo de infección de células eucariotas en cultivo con *S. enterica* ha supuesto un avance significativo en el entendimiento de sus mecanismos de patogenicidad (Dandekar *et al.*, 2012). Este modelo permite analizar tanto la invasión celular, la supervivencia y la proliferación intracelular, como los posibles cambios estructurales sufridos por la bacteria durante la infección. Estas características pueden sufrir variaciones según las estirpes bacterianas utilizadas como

referencia, así como en función de la línea celular empleada (Garai *et al.*, 2012; Alonso & García-del Portillo, 2004; García-del Portillo, 2001).

A.3.1 Comportamiento de *Salmonella* en el interior de células epiteliales

La habilidad de *Salmonella* de invadir células no fagocíticas, como por ejemplo células epiteliales, es una característica que contribuye a su virulencia. Para ello, el patógeno utiliza un mecanismo conocido como “fagocitosis inducida por la bacteria” (Alonso & García-del Portillo, 2004). En este mecanismo intervienen proteínas efectoras secretadas por la bacteria a través del sistema de secreción tipo tres (SST3) de la isla de patogenicidad SPI-1 (McGhie *et al.*, 2009). El SST3 de *Salmonella* es similar al aparato flagelar y está compuesto por un complejo macromolecular de al menos veinte proteínas que forman el aparato de secreción denominado “complejo aguja” (Haraga *et al.*, 2008). Este complejo aguja se dispone a través de las membranas interna y externa y contacta con la membrana de la célula hospedadora por el extremo del canal de secreción. Las proteínas efectoras secretadas a través del SST3 mimetizan las funciones de algunas proteínas de la célula hospedadora (Patel *et al.*, 2005). Por ejemplo, la proteína efectora SipA promueve la polimerización de la actina (McGhie *et al.*, 2009). Gracias a éstas y otras proteínas efectoras, *Salmonella* modula el citoesqueleto de actina y altera la estructura de la membrana eucariota (Srikanth *et al.*, 2011). Tras la internalización de la bacteria, ésta queda envuelta en una vacuola o compartimento fagosomal denominado SCV (“*Salmonella-Containing Vacuole*”) (García-del Portillo & Finlay, 1995). La maduración de la SCV es fundamental para la supervivencia intracelular de *Salmonella*. Durante este proceso, la SCV se aproxima al núcleo y al aparato de Golgi y es entonces cuando *Salmonella* comienza a multiplicarse. Mediante la acción de la proteína efectora SifA, se forman estructuras túbulo-vesiculares denominadas Sifs (“*Salmonella-induced filaments*”), cuya función se cree es conectar varias SCV entre ellas para favorecer la proliferación del patógeno (LaRock *et al.*, 2015).

Salmonella prolifera en el interior de la mayoría de las líneas celulares epiteliales probadas, obteniéndose índices de proliferación (Ipro) [relación de bacterias viables a 24 h post-infección (hpi) frente a 2 hpi] de entre 7-10 veces (Martínez-Moya *et al.*, 1998). Curiosamente, aproximadamente un 20 % de las células epiteliales HeLa infectadas contienen una población citoplasmática de bacterias con una replicación independiente de SPI-2 (Malik-Kale *et al.*, 2012). Esta población de bacterias citoplasmáticas contribuye significativamente a la alta tasa de proliferación observada en células epiteliales.

A.3.2 Comportamiento de *Salmonella* en el interior de células fagocíticas

Las células fagocíticas se emplean también como modelo de infección *in vitro* dada su importancia en la respuesta inmunitaria innata del hospedador. *Salmonella* sobrevive al ambiente hostil existente dentro de fagocitos profesionales como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas (Alonso & García-del Portillo, 2004), ya que modula el tráfico intracelular y neutraliza la actividad de diversos mecanismos efectoras antimicrobianos. El modelo de estudio más extendido es el de macrófagos. En este tipo celular, *Salmonella* se aloja en una SCV en la que emplea proteínas efectoras secretadas por el SST3 de SPI-2 (Uchiya *et al.*, 1999). A diferencia de las células epiteliales, la entrada de *Salmonella* en macrófagos ocurre mediante dos mecanismos: a través de SPI-1, como se ha descrito en células epiteliales; o por fagocitosis, previa opsonización de la bacteria. El que ocurra uno u otro mecanismo de internalización determina el ambiente

intracelular, afectando tanto a la supervivencia como a la replicación intracelular de *Salmonella*, y, como consecuencia, a su virulencia (Drecktrah *et al.*, 2006). Distintos modelos matemáticos y análisis experimentales han demostrado que sólo el 5 % de las veces que *Salmonella* contacta con el macrófago ocurre un evento de internalización del patógeno (Gog *et al.*, 2012). Además, se ha observado que tras un primer evento de infección la probabilidad de una segunda infección disminuye. El macrófago controla el crecimiento de *Salmonella* mediante: i) la producción de intermediarios reactivos de oxígeno (ROI) y de nitrógeno (RNI) (Vazquez-Torres *et al.*, 2000); ii) la privación nutricional, como la ejercida sobre el hierro por la proteína Scl11a1 (Fritsche *et al.*, 2012); y, iii) la síntesis de péptidos antimicrobianos (Ganz, 2003). *Salmonella*, como respuesta a estos tipos de estrés, modifica componentes de la envoltura o neutraliza los compuestos reactivos producidos por las células infectadas. Estas respuestas están mediadas por sistemas sensores de dos componentes como PhoP-PhoQ y PmrA-PmrB, que responden a bajas concentraciones de Mg^{2+} o a la acidificación del medio; así como SoxRS, que se activa en respuesta a ROI y RNI (Shen & Fang, 2012; Flannagan *et al.*, 2009).

La infección por *Salmonella* culmina, en muchas ocasiones, con la muerte del macrófago, fenómeno que favorece la diseminación de la bacteria a otras células (Mastroeni & Grant, 2013). En macrófagos infectados se produce un tipo especial de muerte celular denominada piroptosis. La piroptosis se inicia frente a estímulos provocados por la presencia de *Salmonella* en el ambiente intracelular, más concretamente por la presencia de proteína flagelar (Miao *et al.*, 2011; Fink & Cookson, 2007). La piroptosis se caracteriza por estar inducida por la activación de la caspasa-1 y por desencadenar una respuesta inflamatoria (Miao *et al.*, 2011; Bergsbaken *et al.*, 2009). Se ha propuesto que este tipo de muerte celular favorece un buen control de la infección al inducir señales de alarma.

A.3.3 Comportamiento de *Salmonella* en el interior de fibroblastos

El modelo de infección de fibroblastos con *S. Typhimurium* posee características distintivas respecto a células epiteliales y macrófagos. Una de ellas es la ausencia de muerte celular y el mantenimiento de una baja carga de bacterias intracelulares a todos los tiempos de infección. En estas condiciones, se pueden ensayar las funciones de supervivencia y proliferación bacteriana intracelular separadamente, lo que no es factible en macrófagos (García-del Portillo, 2001). Otro aspecto importante es que el fibroblasto es un tipo celular de distribución ubicua en los tejidos y órganos capaz de interactuar con células inmunocompetentes (Sorrell & Caplan, 2009). Por último, diversos autores consideran el fibroblasto como un posible reservorio de la bacteria durante infecciones crónicas causadas por *S. Typhimurium* (Boyle *et al.*, 2007). Estas características se relacionan con la persistencia de *S. Typhimurium* observada en la mayoría de las líneas de fibroblastos utilizadas, no superando un promedio de dos-tres bacterias por célula (Martínez-Moya *et al.*, 1998). Otro dato que apoya la idea del fibroblasto como reservorio, es el mantenimiento de su integridad y viabilidad durante largos períodos de tiempo aun conteniendo bacteria en su interior (Cano *et al.*, 2003). Estas observaciones concuerdan con lo descrito en tejidos animales, en los que destaca una tasa de crecimiento intracelular baja de *S. Typhimurium* (Helaine *et al.*, 2010).

Este modelo muestra que algunas funciones necesarias para la supervivencia y proliferación de *S. Typhimurium* en macrófagos limitan el crecimiento del patógeno en fibroblastos. Es el caso del sistema de dos componentes PhoP-PhoQ, los reguladores SpvR y SlyA, el factor sigma alternativo RpoS y la proteína IgaA (Cano *et al.*, 2001). La inactivación de estas funciones

causa un marcado incremento en la proliferación intracelular bacteriana durante la infección del fibroblasto.

Las diferencias en el patrón de crecimiento intracelular de *S. Typhimurium* que se han observado en los distintos tipos celulares aquí expuestos dependen de una respuesta tanto por parte del patógeno como por parte de la célula hospedadora (Grant *et al.*, 2009; Mastroeni *et al.*, 2009). En este trabajo nos centraremos principalmente en el papel que desempeña la bacteria en esta interacción.

B. El peptidoglicano

El peptidoglicano o sáculo de mureína es un componente esencial de la pared celular que se localiza en el periplasma de bacterias Gram negativas, entre las membranas interna y externa (Fig. 1), o en el exterior de la membrana plasmática en el caso de bacterias Gram positivas. En bacterias Gram negativas el sáculo supone alrededor del 10 % de la pared celular comparado con el de bacterias Gram positivas, donde constituye aproximadamente el 90 % de la pared. El peptidoglicano es un heteropolímero constituido por largas cadenas glucídicas entrecruzadas por cadenas peptídicas cortas que constituyen una macromolécula con forma de malla, íntegra y elástica que rodea por completo la célula (Silhavy *et al.*, 2010). Sus funciones principales son: i) proteger la integridad celular soportando la presión osmótica interna (Turner *et al.*, 2014; Vollmer, 2012); ii) mantener la morfología celular; iii) dar protección frente a cambios ambientales; iv) ser el soporte estructural de componentes de la membrana externa; y, v) regular el crecimiento y la división celular (Alvarez *et al.*, 2014; Scheffers & Pinho, 2005; van Heijenoort, 2001; Nanninga, 1998). La viabilidad celular depende, por tanto, de su integridad.

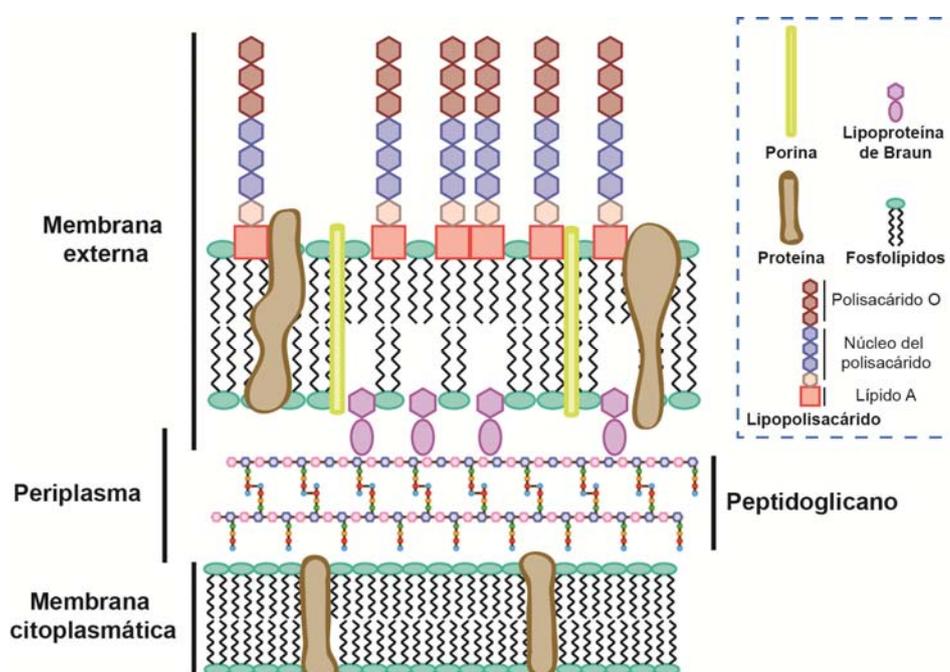


Figura 1. Composición de la envoltura de bacterias Gram negativas. Se muestran los componentes principales de la envoltura: membrana citoplasmática, periplasma y membrana externa. En el periplasma se incluye el peptidoglicano.

Las cadenas glucídicas del peptidoglicano están formadas por repeticiones de disacáridos conteniendo aminoazúcares alternantes, N-acetilglucosamina (NAcGlc) y ácido N-acetilmurámico (NAcMur). Estos disacáridos están unidos mediante enlaces glucosídicos $\beta,1\rightarrow4$ (Vollmer & Bertsche, 2008) catalizados en el periplasma por enzimas con actividad transglicosilasa (TG). La presencia del grupo D-lactilo en el NAcMur permite el anclaje covalente, mediante un enlace amida, de una cadena peptídica (de dos a cinco aminoácidos) a este aminoazúcar. Estas reacciones forman parte de la primera fase de la biosíntesis del peptidoglicano, la cual tiene lugar en el citoplasma. La cadena peptídica contiene aminoácidos L y D, siendo los aminoácidos D sintetizados por racemasas desde los aminoácidos L correspondientes (Cava *et al.*, 2011b). Además, la cadena peptídica presenta un aminoácido dibásico que es importante para permitir la formación de enlaces peptídicos entre cadenas adyacentes (Höltje, 1998). Los componentes habituales de la cadena pentapeptídica (peptidoglicano emergente) en las bacterias Gram negativas son, por orden desde el punto de unión al NAcMur: L-alanina (L-Ala), D-glutámico (D-Glu), ácido *meso*-diaminopimélico (*m*-Dap, aminoácido dibásico), D-alanina (D-Ala), D-alanina (D-Ala) (**Fig. 2**). En la mayoría de bacterias Gram positivas el *m*-Dap es sustituido por una L-Lisina (L-Lys). En el peptidoglicano maduro, una o dos de las últimas D-Ala son hidrolizadas. Dependiendo de las especies y de las condiciones de crecimiento, una pequeña proporción de las cadenas peptídicas contienen glicina (Gly) en vez de D-Ala en las posiciones cuatro y cinco. La formación de los enlaces peptídicos entre cadenas adyacentes está catalizada por la acción de transpeptidasas (TPs) que, predominantemente (93 %) establecen enlaces peptídicos DD entre la D-Ala en posición cuatro de una cadena y el *m*-Dap en posición tres de la cadena adyacente (**Fig. 2**). Además de este tipo de enlaces, aunque con mucha menos frecuencia, existen los entrecruzamientos mediante enlaces peptídicos LD, es decir, entre dos residuos *m*-Dap de cadenas adyacentes (**Fig. 2**). Entre el 40 y el 60 % de los péptidos de la mureína en bacterias Gram negativas están entrecruzados (Quintela *et al.*, 1995). Se denominan muropéptidos a las unidades de disacáridos peptídicos del peptidoglicano obtenidos tras la digestión enzimática de la cadena glucídica. Estos muropéptidos son importantes para el reciclaje de la pared bacteriana así como para procesos de señalización celular. Se emplea la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-“*High Performance Liquid Chromatography*”) para su detección e identificación (Boudreau & Fisher, 2012).

La lipoproteína de la mureína o lipoproteína de Braun (Lpp) es una de las proteínas más abundantes de las membranas de las bacterias Gram negativas y se ancla a la membrana externa por su extremo N-terminal. Aproximadamente, un tercio de las moléculas de Lpp se unen covalentemente a la mureína, de manera que conectan la membrana externa a la capa de peptidoglicano y, por lo tanto, contribuyen a la estabilidad de la envoltura celular (Vollmer & Bertsche, 2008). La Lpp se ancla al peptidoglicano mediante un enlace peptídico entre la Lys del extremo C-terminal de la Lpp y el *m*-Dap de la cadena peptídica del peptidoglicano (Braun & Wolff, 1970). Esta unión se evidencia al digerir el peptidoglicano con una proteasa como la pronasa, quedando sólo dos aminoácidos de la Lpp, Lys y arginina (Arg), unidos al *m*-Dap (Höltje, 1998). La Lpp de *S. Typhimurium* es necesaria para la invasión, la citotoxicidad y la inducción de la síntesis de citoquinas proinflamatorias de la célula hospedadora (Sha *et al.*, 2004).

Una característica peculiar de la cadena glucídica del peptidoglicano es la presencia, en uno de sus extremos, de ácido 1,6-anhidromurámico resultante de la actividad de muramidasa.

Este residuo permite calcular la longitud media de las cadenas glucídicas determinando la proporción de 1,6-anhidromuropéptidos respecto al total (Glauner *et al.*, 1988). La longitud media de las cadenas glucídicas se ha estimado en 25-40 unidades disacáridicas (Quintela *et al.*, 1995), aunque existe un rango muy amplio de longitudes de cadena en una determinada condición, desde 1 a más de 100 disacáridos.

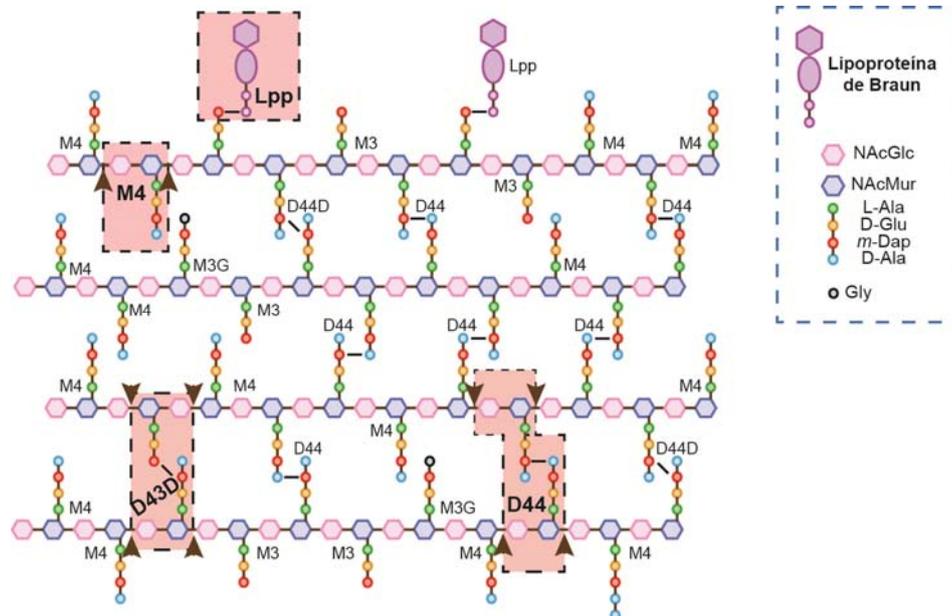


Figura 2. Estructura del peptidoglicano de bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*. Se observan los principales enlaces identificados en el peptidoglicano de *E. coli* y *S. enterica*. La leyenda describe los residuos de azúcares y de aminoácidos en las cadenas peptídicas laterales. Se incluye también la lipoproteína de Braun (Lpp) en el esquema.

La estructura del peptidoglicano presenta una marcada heterogeneidad pudiendo estar compuesto de “forma simultánea” por más de 50 muropéptidos diferentes. Estos muropéptidos difieren en la longitud de las cadenas peptídicas, la presencia de D-Ala o Gly en las posiciones cuatro y cinco, el estado de entrecruzamiento (monómeros, dímeros, trímeros, tetrámeros), el tipo de entrecruzamiento (DD o LD), la presencia de ácido 1,6-anhidromurámico, y la presencia de un dipéptido L-Lys-L-Arg en posición cuatro que aparece tras la digestión proteolítica de la Lpp. Los muropéptidos más abundantes en *S. Typhimurium* son el monómero tetrapeptídico (M4) (Fig. 3) y el dímero tetra-tetrapeptídico con un entrecruzamiento DD (D44) (Fig. 3). El perfil de muropéptidos sufre variaciones según la fase de crecimiento de la bacteria o el medio de cultivo empleado.

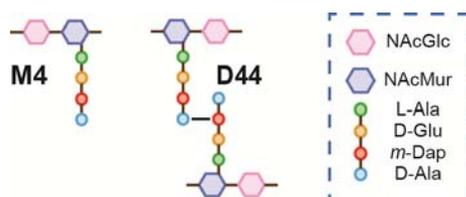


Figura 3. Muropéptidos más abundantes del peptidoglicano de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*. Se indica la estructura de los muropéptidos M4 (monómero tetrapeptídico) y D44 (dímero tetra-tetrapeptídico), los cuales suponen más del 65 % del peptidoglicano de *E. coli* y *S. enterica*.

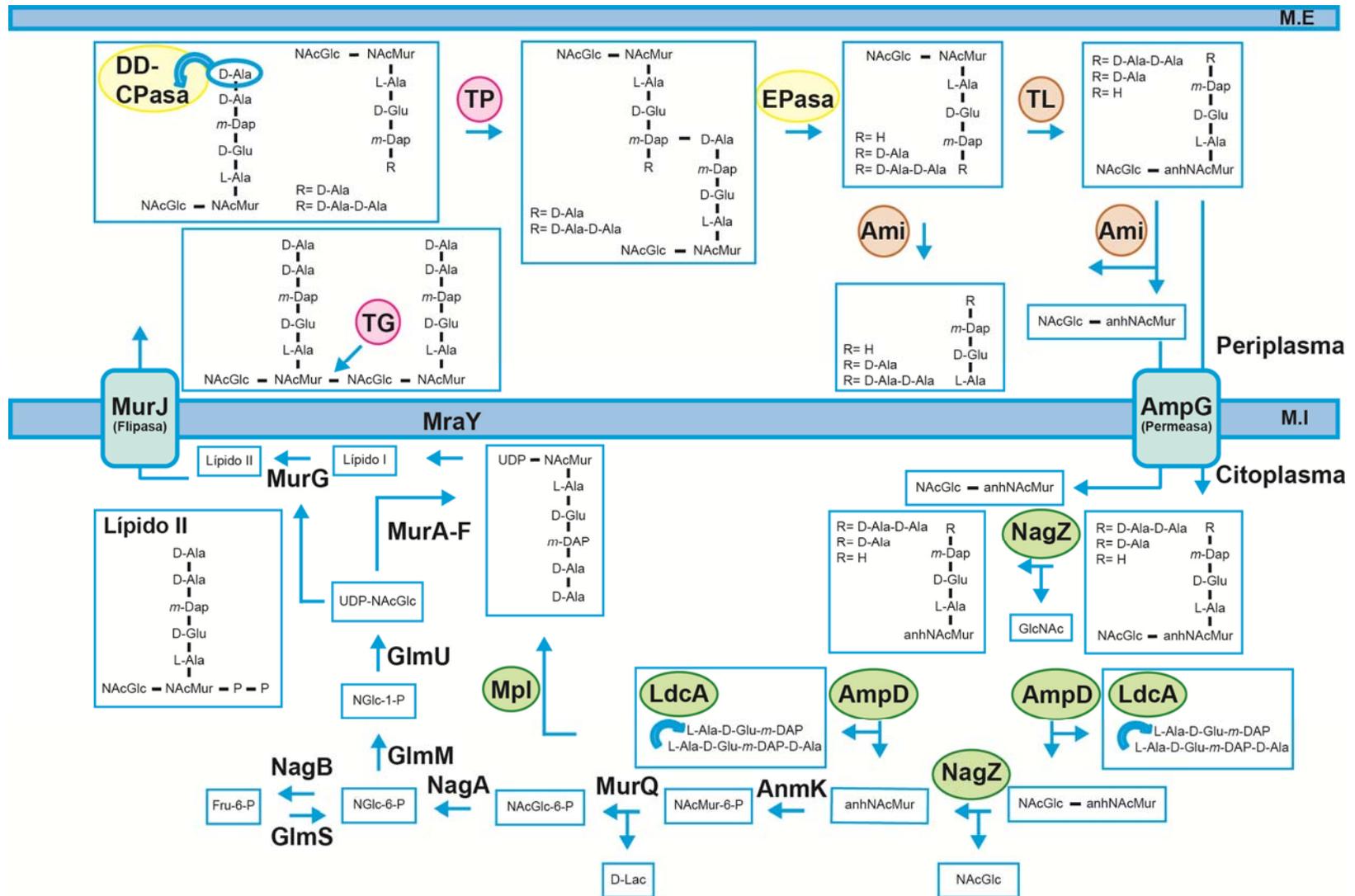


Figura 4. Rutas metabólicas del peptidoglicano caracterizadas en *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*. Se representan las enzimas implicadas en las principales rutas del metabolismo del peptidoglicano. Rosa: enzimas implicadas en el proceso de biosíntesis (BIO); amarillo: enzimas que participan en modificaciones (MOD) de la estructura; marrón: enzimas de hidrólisis (HID); y, verde: enzimas implicadas en el reciclaje (REC). Abreviaturas: Ami, amidasa; DD-CPasa, DD-carboxipeptidasa; EPasa, endopeptidasa; M.E, membrana externa; M.I, membrana interna; TG, transglicosilasa; TL, transglicosilasa lítica; TP, transpeptidasa.

El peptidoglicano es una estructura en permanente cambio al adecuarse al ciclo de crecimiento de la bacteria. En el conjunto de su metabolismo se diferencian cuatro etapas: biosíntesis, modificación, hidrólisis y reciclaje del peptidoglicano (**Fig. 4**).

B.1 Metabolismo del peptidoglicano

B.1.1 Biosíntesis del peptidoglicano

La biosíntesis del peptidoglicano incluye más de veinte reacciones que tienen lugar en tres localizaciones diferentes: i) citoplasma (síntesis de precursores); ii) cara interna de la membrana citoplasmática (síntesis de intermediarios lipídicos); y, iii) periplasma (reacciones de polimerización) (**Fig. 4**).

Los precursores difosfato de uridina-N-acetilglucosamina (UDP-NAcGlc) y difosfato de uridina-ácido-N-acetilmurámico (UDP-NAcMur) se forman en el citoplasma. El UDP-NAcGlc se sintetiza desde la fructosa-6-fosfato mediante tres actividades enzimáticas sucesivas catalizadas por GlmS, GlmM y GlmU. Por otro lado, el UDP-NAcMur es sintetizado desde el UDP-NAcGlc por las enzimas MurA y MurB. El ensamblaje de la cadena pentapeptídica sobre el grupo D-lactilo del UDP-NAcMur se produce escalonadamente y lo realizan las ligasas MurC, D, E y F que adicionan L-Ala, D-Glu, *m*-Dap y el dipéptido D-Ala-D-Ala, respectivamente ([Barreteau et al., 2008](#)) (**Fig. 4**). La proteína integral de membrana MraY cataliza el primer paso de síntesis asociado a membrana, ya que realiza la transferencia del UDP-NAcMur-pentapéptido desde el citoplasma al bactoprenol (C55-P), un transportador asociado a la cara citoplasmática de la membrana interna. A esta molécula se la denomina lípido I. La adición del UDP-NAcGlc al lípido I por la transferasa MurG lo convierte en el lípido II, subunidad que será incorporada al peptidoglicano macromolecular (NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-D-Ala-D-Ala) ([Goffin & Ghuyesen, 2002](#)). El transporte del lípido II desde la cara interna a la cara externa de la membrana citoplasmática es el último paso de la biosíntesis del peptidoglicano y es catalizado por la flipasa MurJ ([Sham et al., 2014](#)).

La elongación del sáculo de mureína tiene lugar en el periplasma mediante sintasas que catalizan la incorporación de lípido II a la mureína preexistente. La mayoría de estas enzimas son "Proteínas de unión a Penicilina" (PBP- "*Penicillin-Binding Protein*"), término que refiere a su capacidad de unir covalentemente penicilina y otros β -lactámicos. Esta unión se produce por la similitud estructural entre el D-Ala-D-Ala terminal de la cadena pentapeptídica y los antibióticos β -lactámicos. Las PBPs se subdividen en las de alto peso molecular (HMW- "*High Molecular Weight*") y las de bajo peso molecular (LMW- "*Low Molecular Weight*") ([Sauvage et al., 2008](#)).

Las PBPs del tipo HMW son multimodulares y responsables de la polimerización del peptidoglicano, es decir, de la inserción de muropéptidos en peptidoglicano preexistente (biosíntesis). La topología de estas PBPs consiste en un extremo citoplasmático, una región transmembrana, y dos dominios localizados en el periplasma donde se encuentra la región catalítica ([Goffin & Ghuyesen, 1998](#)). Dependiendo de la estructura y de la actividad catalítica de su dominio N-terminal, se dividen en PBPs de clase A o de clase B. Las PBPs de clase A incluyen enzimas bifuncionales que presentan actividad transglicosilasa (TG) y transpeptidasa (TP). Estas enzimas bifuncionales son las PBPs 1A, 1B y 1C (**Fig. 5A**). Su dominio N-terminal es el responsable de la actividad TG, que cataliza la adición repetitiva de unidades de disacáridos peptídicos desde el lípido II (sustrato), mientras que su dominio C-terminal tiene actividad TP y es un dominio de unión a penicilina (PB-dominio "*Penicillin Binding*") que cataliza el entrecruzamiento

peptídico entre dos cadenas glucídicas adyacentes. Este dominio C-terminal lo comparten con las PBPs de clase B, enzimas que presentan actividad TP complementada con un papel en la morfogénesis celular (dominio N-terminal) por su interacción con otras proteínas de membrana. Dentro de este grupo se encuentran las PBPs 2 y 3. Además, existe la enzima MtgA (**Fig. 5A**) que sólo presenta actividad TG y que tiene homología de secuencia con genes que codifican proteínas de la clase A. Las PBPs bifuncionales pueden catalizar la reacción de transglucosilación aunque el dominio TP esté inhibido. Sin embargo, la inactivación del dominio TG bloquea la polimerización del PG (Sauvage *et al.*, 2008).

Las PBPs 1A y 1B parecen tener un papel parcialmente redundante *in vivo* aunque tienen diferentes preferencias de localización. La PBP 1B podría ser la PBP bifuncional principal responsable de la síntesis del septo debido a su localización en la mitad de la célula y a su interacción con las proteínas esenciales de la división celular, PBP 3 y FtsN. Por su parte, la PBP 1A es más activa durante la elongación celular, ya que tiene preferencia por la región lateral de la pared. Las PBPs 1A y 1B pueden sustituirse una a la otra, lo que indica que la especificidad no es completa. La ausencia de ambas PBPs es, sin embargo, letal aunque esté presente la PBP 1C, que tampoco es esencial (Vollmer & Bertsche, 2008). Estudios recientes demuestran que dos lipoproteínas de membrana externa, LpoA y LpoB, son esenciales para el funcionamiento *in vivo* de las PBPs 1A y 1B, respectivamente. Cada Lpo se une específicamente a su correspondiente PBP formando complejos transenvoltura Lpo-PBP (King *et al.*, 2014). LpoA estimula la actividad TP de la PBP 1A *in vitro*, sin embargo, LpoB estimula la actividad TG de la PBP 1B. A pesar de esto, ambas facilitan la incorporación de peptidoglicano nuevo al sáculo (Lupoli *et al.*, 2014). LpoB, al igual que PBP 1B, es reclutada principalmente al divisoma, aunque también se puede localizar en el lateral de la pared. Por otro lado, LpoA se localiza más en la pared lateral durante la elongación. La biosíntesis del peptidoglicano necesitaría por tanto, no sólo del control o activación de sintetas desde dentro de la bacteria (citoesqueleto) sino también desde fuera, mediante proteínas asociadas a la membrana externa.

Las reacciones de transpeptidación catalizadas por PBPs ocurren en tres pasos, comenzando con la unión de la cadena donadora a la enzima cuyo sitio activo tiene una serina (Ser). A continuación, esta Ser ataca el enlace peptídico D-Ala-D-Ala del extremo C-terminal formando un intermediario acil-enzima y liberando el residuo D-Ala terminal. Finalmente, este intermediario es o bien hidrolizado por agua, con la liberación de un péptido (reacción de carboxipeptidación), o bien, entrecruzado con el grupo amino del *m*-Dap de la cadena aceptora para formar un nuevo enlace peptídico (Lovering *et al.*, 2012; Lupoli *et al.*, 2011). La inmensa mayoría de las reacciones de transpeptidación, especialmente la incorporación de precursores en peptidoglicano preexistente (Höltje, 1998; Quintela *et al.*, 1995), están catalizadas por DD-transpeptidasas (DD-TPs) que forman un enlace entre el grupo carboxilo de la D-Ala en posición cuatro de una cadena peptídica (cadena donadora) y el grupo amino del *m*-Dap (aminoácido dibásico, cadena receptora) en posición tres de la cadena adyacente. Estas DD-TPs son las PBPs HMW 1A, 1B, 1C, 2 y 3 (**Fig. 5A**). La PBP 2 es esencial para la elongación de la bacteria y el mantenimiento de su morfología. Esta PBP se localiza principalmente en la pared lateral y su inhibición con antibióticos como mecilnam provoca la formación de células esféricas incapaces de formar colonias (Uehara & Park, 2008). La PBP 3 o FtsI es una de las proteínas esenciales del divisoma y se encarga de catalizar los entrecruzamientos de las cadenas glucídicas

durante la división, ya que su inhibición provoca que las bacterias crezcan formando filamentos. La PBP 3 está involucrada en muchas interacciones del divisoma, por ejemplo, interacciona directamente con la PBP 1B. Tanto la PBP 3 como la PBP 1B trabajan conjuntamente para incorporar precursores en el peptidoglicano existente (Sauvage *et al.*, 2014). Además, existen LD-transpeptidasas (LD-TPs) que utilizan el mismo grupo receptor que las DD-TPs pero varían el aminoácido donador, siendo éste el grupo carboxilo del *m*-Dap (Vollmer *et al.*, 2008b; Höltje, 1998). De este modo, la reacción se produce por la acción coordinada de DD-CPasas y de LD-TPasas. Las primeras cortan la D-Ala de la posición cinco dejando el tetrapéptido como sustrato de las LD-TPasas, las cuales cortan el enlace del centro L entre el *m*-DAP y la D-Ala (actividad LD-CPasa) que aporta la energía suficiente para el establecimiento del enlace entre este *m*-Dap con el *m*-Dap de la cadena adyacente (Sanders & Pavelka, 2013; van Heijenoort, 2011).

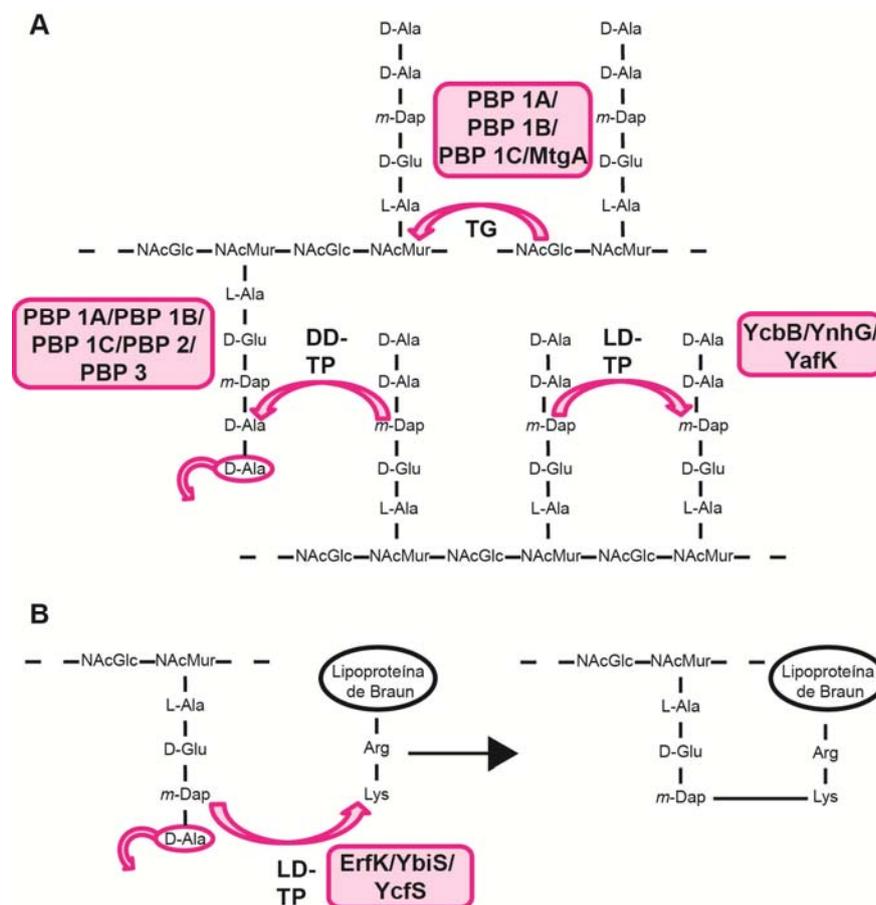


Figura 5. Enzimas implicadas en rutas de biosíntesis (BIO) del peptidoglicano. A: reacciones de biosíntesis catalizadas por enzimas con actividades transglicosilasa (TG) y transpeptidasa (TP). **B:** reacción de biosíntesis en la que se produce el anclaje covalente de la lipoproteína de Braun (Lpp).

Estas reacciones de LD-transpeptidación deben ser importantes para la célula en las condiciones en las que no haya cadenas pentapeptídicas suficientes para un entrecruzamiento DD. Las enzimas descritas para estas reacciones son YcbB e YnhG (**Fig. 5A**). Además de estas reacciones, existen LD-TPs que catalizan el entrecruzamiento entre la Lpp de Braun y la mureína estableciendo un enlace entre el *m*-Dap de la cadena peptídica y la Lys⁷⁸ de la Lpp de *S. Typhimurium*. Las enzimas encargadas de esta reacción son ErfK, YbiS e YcfS (**Fig. 5B**). Estas LD-TPs son proteínas periplásmicas con un péptido señal y además, comparten el dominio catalítico YkuD. A diferencia del residuo Ser en el sitio activo de las PBP, el dominio YkuD tiene un residuo catalítico de cisteína (Cys) (Magnet *et al.*, 2007). ErfK, YbiS, YcfS e YnhG, por su parte, comparten un dominio rico en lisinas (LysM) de unión no covalente al peptidoglicano que también está presente en muchas hidrolasas (Sanders & Pavelka, 2013) e YcbB tiene un dominio de unión a peptidoglicano. Ya que las LD-TPs reconocen centros D y L, son insensibles a los antibióticos β -lactámicos, es decir, no son “PBPs”. Se ha postulado que estas reacciones podrían permitir la supervivencia de la bacteria en presencia de bajas concentraciones de estos antibióticos (Sanders & Pavelka, 2013). Por otro lado, las LD-TPs son sensibles a antibióticos de tipo carbapenem, los cuales actúan mediante la acilación de su residuo catalítico Cys. Según algunos autores, los enlaces *m*-Dap-*m*-Dap podrían, además, reforzar la pared en respuesta a estrés y condiciones de no replicación (Goffin & Ghuyssen, 2002).

B.1.2 Modificación e hidrólisis del peptidoglicano

Para crecer y dividirse, la bacteria no sólo requiere de enzimas de biosíntesis de peptidoglicano sino que, además, necesita cortar los enlaces covalentes del sáculo preexistente para permitir la inserción de nuevo material. Este hecho marca el papel importante que juegan el grupo de enzimas de hidrólisis del peptidoglicano.

Las PBPs del tipo LMW son peptidasas que se incluyen dentro de la clase C de las PBPs, son enzimas solubles involucradas en la modificación del peptidoglicano, de modo que regulan su grado de entrecruzamiento. Su actividad influye, además, en la hidrólisis y reciclaje del peptidoglicano. Dentro de este grupo se encuentran las PBPs 4, 5, 6, 6B, 7 y AmpH. Todas ellas están ancladas a la membrana interna aunque desarrollan su actividad en el periplasma.

Las hidrolasas (también denominadas autolisinas) se localizan en el periplasma y digieren el sáculo de mureína en fragmentos pequeños (muro péptidos). Se clasifican por su especificidad catalítica sobre los distintos tipos de enlaces covalentes del peptidoglicano. Esta especificidad se debe a la presencia de aminoácidos “no proteicos” (D-Ala, D-Glu y *m*-Dap) en las subunidades peptídicas y a la estereoquímica inusual (DD, DL, LD) de los enlaces peptídicos. De este modo, existen N-acetilmuramidasa y N-acetilglucosaminidasa encargadas de digerir enlaces de la cadena glucídica, así como N-acetilmuramyl-L-alanina amidasa (denominadas comúnmente amidasa, Ami), endopeptidasas (EPasas) y carboxipeptidasas (CPasas) que digieren enlaces de la cadena peptídica.

Las N-acetilmuramidasa digieren el enlace glucosídico β ,1 \rightarrow 4 entre el NAcMur y la NAcGlc mientras que las N-acetilglucosaminidasa hidrolizan el enlace glucosídico β ,1 \rightarrow 4 entre la NAcGlc y el NAcMur. Dentro de las N-acetilmuramidasa están las transglicosilasa líticas (TLs) y la lisozima. Las TLs no sólo hidrolizan enlaces glucosídicos sino que, además, catalizan una reacción intramolecular por la cual se forma un enlace anhidro entre el C₁ y el C₆ del NAcMur

(1,6-anhidroNAcMur). Existen al menos siete enzimas con esta actividad: MltA, MltB, MltC, MltD, EmtA (MltE), MltF y Slt. Todas ellas excepto Slt (“*Soluble lytic transglycosylase*”), que está soluble en el periplasma, están ancladas a la membrana externa (Mlt-“*Membrane-bound lytic transglycosylase*”). Todas estas enzimas son “exoenzimas”, es decir, cortan el enlace del extremo de la cadena glucídica. Además, EmtA, MltB, MltD, Slt y MltC, aunque esta última en menor medida, son endoenzimas, lo que implica flexibilidad para cortar enlaces glucosídicos internos (Lee *et al.*, 2014) (Fig. 6).

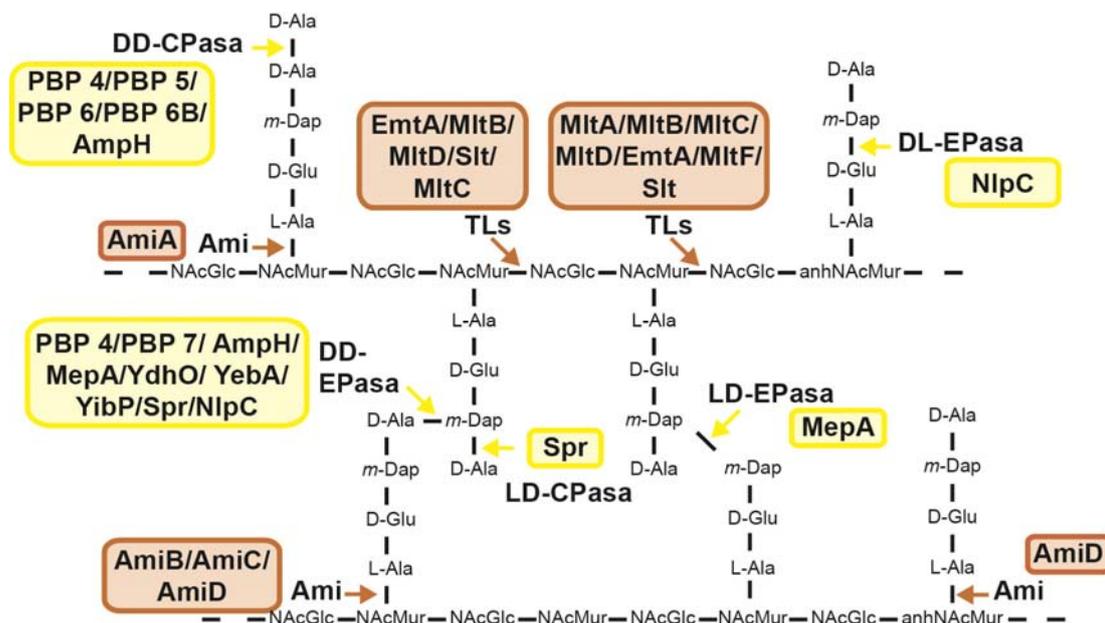


Figura 6. Enzimas implicadas en reacciones de modificación (MOD) e hidrólisis (HID) del peptidoglicano. Amarillo: enzimas implicadas en la modificación (MOD) del peptidoglicano; marrón: enzimas que intervienen en la hidrólisis (HID). Abreviaturas: Ami, amidasa; CPasa, carboxipeptidasa; EPasa, endopeptidasa; Tls, transglicosilasa lítica.

Dentro de las enzimas que digieren enlaces peptídicos están las amidasas, que cortan el enlace entre las cadenas glucídicas y el péptido lateral, es decir, entre el NAcMur y la L-Ala en posición uno. Se han descrito en *E. coli* un total de cinco amidasas: AmiA, AmiB, AmiC, AmiD y AmpD (Fig. 6). La presencia de un péptido señal en AmiA, AmiB, AmiC y AmiD indica su localización periplásmica siendo AmiD la única lipoproteína, lo que sugiere que estaría anclada a la membrana externa. Sin embargo, AmpD se localiza en el citoplasma. AmiA permanece dispersa en el periplasma a lo largo del ciclo celular. Por el contrario, AmiC se concentra en el septo durante la división, lo que promueve la separación de las células hijas, y está dispersa durante el resto del ciclo (Heidrich *et al.*, 2001). AmiA, AmiB y AmiC actúan sobre peptidoglicano macromolecular mientras que AmpD sólo reconoce fragmentos de peptidoglicano de bajo peso molecular. AmpD corta específicamente enlaces entre 1,6-anhidroNAcMur y L-Ala, por lo que se menciona más abajo como una enzima del reciclaje del peptidoglicano. AmiD tiene un amplio rango de sustratos, siendo el sustrato más eficiente el M4 (Pennartz *et al.*, 2009; Uehara & Park, 2007). AmiA corta fragmentos de peptidoglicano no entrecruzados que sean al menos tetrasacáridos

(Lupoli *et al.*, 2009). AmiA, AmiD y AmpD son enzimas dependientes de zinc (Zn^{2+}) también denominadas metaloenzimas de Zn^{2+} (van Heijenoort, 2011).

Las enzimas endopeptidasas (EPasas) hidrolizan enlaces a distintos niveles de la cadena peptídica lateral mientras que las carboxipeptidasas (CPasas) cortan el enlace peptídico terminal. En estos grupos se incluyen, principalmente, las PBPs LMW además de alguna enzima insensible a penicilina. Tanto la PBP 4 como AmpH tienen doble actividad: son DD-EPasas y DD-CPasas. La actividad DD-EPasa hidroliza el enlace D-Ala-*m*-Dap entre dos cadenas adyacentes, mientras que la DD-CPasa actúa sobre el enlace D-Ala-D-Ala terminal de la cadena peptídica (**Fig. 6**). Tanto la PBP 7 como MepA y YibP (EnvC) (las dos últimas insensibles a penicilina) comparten la actividad DD-EPasa con las enzimas descritas anteriormente. MepA, adicionalmente, tiene actividad LD-EPasa (Vollmer & Bertsche, 2008) y está libre en el periplasma mientras que YibP está anclada a la membrana interna, además, ambas son metaloenzimas de Zn^{2+} . Por su parte, las PBPs 5, 6 y 6B comparten actividad DD-CPasa (**Fig. 6**). La PBP 5, además, tiene un papel importante en la determinación del diámetro bacteriano y en la formación del septo en el lugar apropiado, aunque no parece estar asociada directamente a las proteínas del divisoma o del elongasoma sino que está dispersa a lo largo de la superficie de la bacteria. Un mutante de delección de la PBP 5 produce bacterias con una morfología aberrante además de un aumento de subunidades pentapeptídicas en el peptidoglicano, situación que no se produce con el mutante de la PBP 6 (Ghosh *et al.*, 2008). En conclusión, la función de la PBP 5 parece relacionarse con el control de la disponibilidad de subunidades pentapeptídicas para facilitar el entrecruzamiento de cadenas peptídicas mediante TPs. La PBP 6, por su parte, podría tener un papel importante en la estabilización del peptidoglicano en fase de crecimiento estacionaria, donde presenta altos niveles de expresión (van der Linden *et al.*, 1992). Todas estas PBPs, incluida AmpH, presentan un dominio β -lactamasa con unos niveles muy bajos de actividad.

Existe un grupo de enzimas que comparten el dominio Pfam NlpC_P60 que contiene una tríada catalítica cisteína-histidina-histidina (Cys-His-His), siendo la Cys el residuo más importante para la actividad peptidasa (Aramini *et al.*, 2008) y por lo tanto, siendo insensibles a penicilina. En este grupo se incluyen las enzimas Spr, YdhO y NlpC. Spr e YdhO presentan actividad DD-EPasa al igual que PBP 4, 7 y MepA (**Fig. 6**). Además, Spr y NlpC son lipoproteínas de membrana externa que tienen actividad CPasa. En el caso de Spr, esta actividad CPasa es LD sobre un dímero tetra-tetrapeptídico dejando como producto de su actividad un dímero tri-tetrapeptídico. En el caso de NlpC, la actividad es DL-CPasa (Anantharaman & Aravind, 2003) convirtiendo el tripéptido L-Ala-D-Glu-*m*-Dap en el dipéptido L-Ala-D-Glu (**Fig. 6**).

Una actividad no controlada de estas autolisinas podría destruir la integridad del sáculo, lo que explica que la mayoría de ellas estén sometidas a una fuerte regulación (van Heijenoort, 2011). Otro aspecto importante es el nivel de actuación de estas hidrolasas durante el crecimiento y la división de la célula. En una generación *E. coli* pierde entre el 40 y el 50 % de la mureína total en forma de anhidromuropéptidos. Es una tasa de reemplazo muy elevada, considerando que se tiene que mantener la integridad del sáculo. No obstante, la fase de reciclaje del peptidoglicano es muy eficiente, asegurando que la gran mayoría de estos muropéptidos se reincorpore en el ciclo de biosíntesis. Como conclusión, las enzimas de modificación e hidrólisis, además de tener una función esencial en el crecimiento del sáculo, están involucradas en los procesos de remodelación y reciclaje del peptidoglicano.

B.1.3 Reciclaje del peptidoglicano

Las bacterias Gram negativas reciclan ~90 % de los productos de la mureína liberados por las hidrolasas. La ruta de reciclaje incluye tanto el transporte de los productos de degradación desde el periplasma al citoplasma, así como su entrada a la ruta de biosíntesis y su reincorporación al peptidoglicano macromolecular (Olrichs *et al.*, 2011). El paso de los productos de degradación desde el periplasma hacia el citoplasma ocurre a través de AmpG, una proteína transmembrana con actividad permeasa específica para anhidromuropéptidos (Uehara & Park, 2003). Estos anhidromuropéptidos son degradados, por la acción de varias enzimas, hasta el tripéptido L-Ala-D-Glu-*m*-Dap. Las enzimas que participan en el reciclaje del peptidoglicano incluyen, junto a AmpG, NagZ, LdcA, AmpD e YcjI (MpaA) (Fig. 7). Además de estos anhidromuropéptidos, otros productos de degradación del peptidoglicano son transportados al citoplasma mediante Opp, una permeasa de oligopéptidos inespecífica, y por NagE y MurP, dos permeasas de péptidos de mureína. NagZ hidroliza en el citoplasma el enlace entre la NAcGlc y el anhNACMur de un monómero tripeptídico o tetrapeptídico (Uehara & Park, 2003). El mutante nulo Δ nagZ de *E. coli* es viable aunque se ha demostrado que esta enzima es absolutamente necesaria para el proceso de reciclaje. Los productos de la actividad de NagZ son por un lado la NAcGlc y por otro el anhNACMur con o sin la cadena peptídica (Vötsch & Templin, 2000; Cheng *et al.*, 2000). Este último producto es el sustrato de la amidasa AmpD, que hidroliza específicamente el enlace entre 1,6-anhidroNACMur y L-Ala. El tetrapéptido L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-D-Ala es rápidamente procesado por LdcA (“LD-carboxypeptidase A”), que hidroliza la última D-Ala (Fig. 7) (Das *et al.*, 2013). LdcA es una serinproteasa que sólo es activa sobre monómeros no entrecruzados (que contengan tanto NAcMur como 1,6-anhidroNACMur), sobre UDP-NACMur-tetrapéptido y, de modo más eficiente, sobre el tetrapéptido libre L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-D-Ala (Park & Uehara, 2008). Mpl (“Murein peptide ligase”) cataliza la unión del tripéptido L-Ala-D-Glu-*m*-Dap al UDP-NACMur, de manera que un tripéptido libre se puede reincorporar a la ruta de biosíntesis de la mureína (Mengin-Lecreux *et al.*, 1996). La actividad de Mpl no se restringe sólo a la reutilización del tripéptido, sino que también es capaz de reutilizar tetrapéptidos y pentapéptidos *in vivo* (Hervé *et al.*, 2007). Mpl no es esencial para el crecimiento de la bacteria (Mengin-Lecreux *et al.*, 1996), por lo que se puede considerar simplemente una ruta que complementa la síntesis *de novo*. Además, los dos aminoazúcares también son reciclados para la biosíntesis de mureína y lipopolisacárido (Uehara & Park, 2003). Otra enzima que participa en el reciclaje es YcjI (MpaA-“Murein peptide amidase A”), la cual procesa péptidos derivados del reciclaje de la mureína y se encarga de cortar el enlace D-Glu-*m*-Dap del tripéptido L-Ala-D-Glu-*m*-Dap. Sin embargo, es incapaz de hidrolizar este mismo enlace en el tetrapéptido L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-D-Ala, por lo que se clasifica como una DL-CPasa. YcjI tiene además un sitio de unión a Zn²⁺, por lo que se puede considerar una metalocarboxipeptidasa. El gen *ycjI* se localiza adyacente al gen *mppA* en el cromosoma de *Salmonella*, gen que codifica para un transportador periplásmico de tripéptidos de mureína. El acoplamiento genético de estos genes y de sus funciones bioquímicas sugiere que YcjI y MppA forman parte de un patrón catabólico adicional para el reciclaje de péptidos derivados del peptidoglicano.

La cascada de reciclaje del peptidoglicano regula la biodisponibilidad de muropéptidos solubles eliminándolos del ambiente y, por lo tanto, evitando su detección por el hospedador (Johnson *et al.*, 2013).

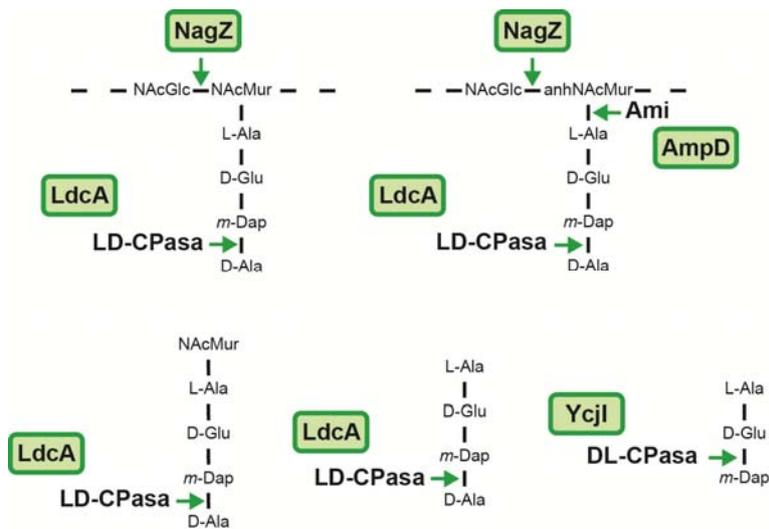


Figura 7. Enzimas que intervienen en las rutas de reciclaje (REC) del peptidoglicano. Todas estas enzimas se disponen en el citoplasma de la bacteria. Abreviaturas: Ami, amidasa; CPasa, carboxipeptidasa; EPasa, endopeptidasa.

B.2 Modos de crecimiento y regulación de la biosíntesis del peptidoglicano

El mantenimiento de la integridad y morfología de la célula bacteriana requiere que la función de las sintasas e hidrolasas involucradas en el crecimiento y la división del sáculo de peptidoglicano esté estrechamente regulada, tanto en el espacio como en el tiempo.

Puesto que el sáculo está en un estado de continuo cambio, cualquier modelo estructural tiene que tener la habilidad de acomodarse a los cambios en tamaño y morfología que sufre la célula. Distintos estudios sugieren una tendencia a que las cadenas glucídicas estén más entrecruzadas en los extremos que en el resto de la superficie del sáculo. Mediante estudios de dispersión de neutrones sobre pared celular purificada se ha observado que el sáculo está constituido por una mezcla de regiones mono-capa (75 %) y tri-capa (25 %) aunque no hay datos disponibles de la distribución de éstas. La identificación de trímeros y tetrámeros en el sáculo hace pensar que la estructura es de multi-capa (Vollmer *et al.*, 2008a).

El sáculo de una bacteria en fase de crecimiento exponencial presenta un entrecruzamiento de entre el 27-35 %. Entre el 7 % y el 16 % de estos entrecruzamientos son mediante enlaces LD. A pesar de que la presencia de muropéptidos triméricos (3-4 %) y tetraméricos (0,2 %) es muy baja respecto a los dímeros (30-40 %), parecen tener un papel estructural importante, ya que representan sitios de unión entre las cadenas glucídicas. El peptidoglicano de nueva síntesis está menos entrecruzado y tiene poca Lpp unida covalentemente, sin embargo, es más rico en muropéptidos con una cadena pentapeptídica (donador para las reacciones de DD-transpeptidación) y las cadenas glucídicas son de una mayor longitud. La transición de una fase de crecimiento exponencial a estacionaria conduce a cambios drásticos en la composición del peptidoglicano y, por lo tanto, en su estructura (Vollmer *et al.*, 2008a). El grado de entrecruzamiento aumenta del 27-35 al 36-42 %, la longitud de la cadena glucídica disminuye de 25-40 a 15-18 disacáridos y el contenido de Lpp unida a mureína aumenta del 8-10 % al 13-15 %. La diferencia en el nivel de entrecruzamiento en el peptidoglicano

envejecido puede deberse al gran incremento del enlace *m*-Dap-*m*-Dap (LD) (del 7 % al 12 % del total de muropéptidos) (Vollmer *et al.*, 2008a), ya que en estos casos no hay disponibilidad de los pentapéptidos donadores que establecen los entrecruzamientos DD (Höltje, 1998). Además de todas estas modificaciones, *E. coli* es capaz de sobrevivir reduciendo el contenido de peptidoglicano cuando hay una inhibición transitoria de biosíntesis de pared celular (Prats & de Pedro, 1989).

En el caso de bacterias con morfología bacilar, la biosíntesis del peptidoglicano tiene dos modos claros de crecimiento: uno asociado a la elongación y otro a la formación del septo de división. Durante la elongación, los nuevos entrecruzamientos se forman principalmente entre cadenas glucídicas nuevas y viejas, mientras que durante la división celular hay también entrecruzamientos entre dos cadenas nuevas (Cava *et al.*, 2013).

La elongación del sáculo se produce por la incorporación de precursores del peptidoglicano en distintas localizaciones de la estructura cilíndrica de la bacteria hasta duplicar su tamaño, todo ello manteniendo el diámetro celular. Todavía no está claro si las cadenas glucídicas se incorporan individualmente o como tripletes (modelo de crecimiento tres-a-uno descrito por Höltje), aunque la capacidad de las sintasas del peptidoglicano de producir parejas de cadenas glucídicas entrecruzadas apoya la idea de que estas cadenas podrían insertarse en el sáculo como parejas entrecruzadas o incluso polímeros de más número de cadenas (den Blaauwen *et al.*, 2008). Esta mureína lateral tiene un reemplazo rápido. Existe una estructura citoesquelética dinámica, similar a la de las células eucariotas, compuesta por sintasas e hidrolasas de la mureína asociadas con elementos citoesqueléticos (MreB, MreC, MreD, PBP2). La proteína MreB es una proteína citoplasmática, similar a la actina, necesaria durante la elongación del peptidoglicano para mantener la morfología de la bacteria (Typas *et al.*, 2012). Los complejos multienzimáticos de hidrolasas y sintasas aseguran que las hidrolasas sólo estén activas en sitios de síntesis (Höltje, 1998).

La síntesis de peptidoglicano durante la formación del septo se localiza en la mitad celular, disminuyendo el diámetro (invaginación) y produciendo los nuevos polos celulares en las células hijas (Cava *et al.*, 2013). Este peptidoglicano tiene una vida media larga y no sufre modificaciones durante varias generaciones, por lo que los polos celulares se pueden considerar estructuras estables de peptidoglicano inerte. La incorporación de peptidoglicano en el sitio de la división celular depende de la formación de un anillo (anillo Z) por la proteína FtsZ, proteína similar a la tubulina. Más de diez proteínas esenciales, entre ellas, alguna sintasa del peptidoglicano, se localizan en el anillo Z para formar el divisoma (Goehring & Beckwith, 2005).

B.3 Inhibidores de la biosíntesis del peptidoglicano

El aumento de aislados bacterianos resistentes a antibióticos obliga a una búsqueda continua de nuevos compuestos, siendo la pared celular una de las dianas más prometedoras. Dos aspectos importantes en este contexto son: i) que muchas de las proteínas implicadas en la síntesis del peptidoglicano son esenciales para la viabilidad celular y, ii) que muchos de los componentes de la envoltura bacteriana son exclusivos del reino Bacteria (Macheboeuf *et al.*, 2006). Sin embargo, también existe el problema de que muchos compuestos no atraviesan la membrana citoplasmática y, por lo tanto, podrían no alcanzar la diana deseada (Barreteau *et al.*, 2008).

La estructura de los antibióticos β -lactámicos, como la penicilina, consiste en un dipéptido cíclico de dos aminoácidos: L-cisteína (L-Cys) y D-valina (D-Val). La conformación de uno de los extremos es casi idéntica al dipéptido D-Ala-D-Ala terminal de la cadena peptídica del peptidoglicano, que es la diana de la transpeptidación. Una característica crucial es que el enlace reactivo CO-N del anillo β -lactámico de estos antibióticos está situado exactamente en la misma posición que el enlace CO-N del D-Ala-D-Ala terminal. Debido a esta similitud estructural, los β -lactámicos actúan como sustratos suicidas, uniéndose al sitio activo de las TPs, normalmente ocupado por D-Ala-D-Ala (Kong *et al.*, 2012). La Ser del sitio activo del dominio TP ataca el grupo carbonilo del anillo β -lactámico, con lo que ese anillo se abre y se forma un complejo acil-enzima covalente estable que impide la actividad de las PBP y, por lo tanto, una reducción del entrecruzamiento del peptidoglicano (Lovering *et al.*, 2012; Zapun *et al.*, 2008).

Además de inhibir la actividad transpeptidasa de las PBP, el mecilinam y otros β -lactámicos estimulan un ciclo de síntesis y degradación de la pared celular fallido que contribuye a su actividad bactericida. Así, en su presencia, enzimas como Slt, reducen notoriamente los niveles de precursores del peptidoglicano (Cho *et al.*, 2014).

El modo más eficaz de la bacteria para contrarrestar el efecto de los β -lactámicos es la producción de β -lactamasas que son liberadas al periplasma. Estas enzimas inactivan el antibiótico mediante la hidrólisis del anillo β -lactámico con unas tasas de reemplazo elevadas (Macheboeuf *et al.*, 2006). Todas las PBP tienen actividad β -lactamasa en mayor o menor medida, siendo la PBP 5 la que presenta mayor actividad. La inhibición de las PBP produce un desequilibrio en el metabolismo de la pared celular que conduce a la inhibición del crecimiento o la lisis.

Además del desarrollo de nuevos β -lactámicos, se están siguiendo aproximaciones nuevas. Una de ellas busca inhibidores de TPs cuya estructura química sea distinta a la de los β -lactámicos, haciendo poco probable una resistencia cruzada. La segunda, prioriza la búsqueda de inhibidores de la actividad TG de las PBP, ya que en muchos casos es esencial para la supervivencia (Macheboeuf *et al.*, 2006).

Las reacciones de transglicosilación producen dos productos: un polímero en crecimiento y un UPP ("*Undecaprenyl Pyrophosphate*"). Los residuos de UPP tienen analogía estructural con el antibiótico bacitracina, de modo que este antibiótico evita la desfosforilación del UPP a UP ("*Undecaprenyl Phosphate*") (Lovering *et al.*, 2012). La transglicosilación se inhibe por el antibiótico moenomycin, que se une al sitio activo de la enzima por su analogía estructural con el lípido II.

La lisozima es una de las enzimas de defensa bacteriolítica más importante de nuestro sistema inmunitario. Está presente en las secreciones mucosas de los mamíferos, así como en los fagolisosomas y gránulos secretorios de fagocitos profesionales. Esta enzima es una muramidasa del peptidoglicano, que además es catiónica, por lo que se une a las cargas negativas de la pared celular bacteriana de modo que, a través de las interacciones electrostáticas, hidroliza el enlace glucosídico $\beta,1\rightarrow4$ entre el NAcMur y la NAcGlc. La hidrólisis de las cadenas glucídicas lleva a la degradación de la pared celular y, por lo tanto, a la lisis de la bacteria por la presión osmótica interna. En algunas bacterias patógenas se han observado modificaciones del peptidoglicano que consiguen evadir el reconocimiento por parte del hospedador así como aumentar la resistencia a antibióticos (Davis & Weiser, 2011). Estas modificaciones pueden establecerse sobre la cadena

glucídica, para resistir a la actividad catalítica de la lisozima (adición de ácido glicólico, vía N-acilación, al NAcMur), o sobre la cadena peptídica (modificaciones del D-Glu o del *m*-Dap).

B.4 Papel del peptidoglicano en el reconocimiento de la infección por el sistema de defensa innato de la célula eucariota

La bacteria detecta muropéptidos como señal de la presencia de antibióticos frente a la biosíntesis de su pared celular (Boudreau *et al.*, 2012), mientras que la célula eucariota detecta muropéptidos para activar defensas en respuesta a una infección bacteriana. La capacidad de los muropéptidos para regular la respuesta del hospedador se debe al hecho de que las células eucariotas no producen peptidoglicano y, sin embargo, han desarrollado estrategias para la detección tanto de peptidoglicano intacto como de muropéptidos (Humann & Lenz, 2009).

El sistema inmunitario innato es la primera línea de defensa frente a patógenos microbianos. Este sistema utiliza sensores, conocidos como “Receptores reconocedores de patrones” (PRRs-“*Pattern-Recognition Receptors*”), que se activan por estructuras derivadas de la bacteria denominadas “Patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs-“*Pathogen-Associated Molecular Patterns*”). Los PRRs de mamíferos incluyen receptores transmembrana “*Toll-like*” (TLRs-“*Toll-Like Receptors*”); receptores intracelulares citoplasmáticos con dominios de unión a nucleótidos y repeticiones ricas en leucina (NLRs-“*intracellular Nucleotide-binding domain/Leucine-rich repeat Receptor*”); receptores inducibles por ácido retinoico (RLRs-“*Retinoic acid-inducible gene-1-Like Receptors*”); y, proteínas de reconocimiento del peptidoglicano (PGRPs-“*Peptidoglycan-Recognition Proteins*”). Estos receptores están coordinados a nivel funcional y activan cascadas de señalización de la célula hospedadora para, finalmente, montar una respuesta de defensa que comprende lisozima, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, y péptidos antimicrobianos, entre otros (Sukhithasri *et al.*, 2013). Los PRRs además, inducen la producción de citoquinas necesarias para reclutar células inmunitarias y activar células fagocíticas.

Los PAMPs bacterianos incluyen muropéptidos derivados del peptidoglicano, lipopéptidos derivados de la lipoproteína, segmentos del lipopolisacárido derivados de la membrana externa, ácido lipoteicoico y RNA y DNA bacterianos (Boudreau *et al.*, 2012).

Existen dos tipos de receptores NLRs: Nod1 y Nod2 (Nod-“*Nucleotide oligomerization domain*”) que reconocen muropéptidos resultantes de la degradación del peptidoglicano. Estos receptores tienen tres dominios: un dominio C-terminal con repeticiones ricas en leucina (LRR-“*Leucine-Rich Repeat*”) responsable del reconocimiento del ligando, un dominio central Nod que favorece la oligomerización y tiene actividad ATPasa, y un dominio N-terminal de reclutamiento de caspasa (CARD-“*Caspase-Recruitment Domain*”). El interés por los receptores Nod se debe a su correlación con enfermedades humanas, como la enfermedad de Crohn, y a su papel crítico en la respuesta autofágica a infecciones bacterianas.

El muropéptido reconocido por Nod1 es el monómero tripeptídico (M3) (**Fig. 8**) aunque la presencia de la fracción glucídica no es imprescindible, de hecho, la unidad mínima activadora es D-Glu-*m*-Dap (iE-Dap). Nod2 reconoce un muramil dipéptido (MDP) (**Fig. 8**). La estimulación de ambos receptores activa la cascada de señalización de NF-κB. Nod1 es el receptor principal del peptidoglicano y se expresa constitutivamente en gran variedad de tejidos y tipos celulares. Por el contrario, Nod2 sólo se expresa en monocitos, macrófagos, células dendríticas y, en menor medida, en células epiteliales (Wheeler *et al.*, 2014).

El peptidoglicano puede ser también blanco de las proteínas de reconocimiento de peptidoglicano, PGRPs, involucradas en destruir al patógeno invasor. Todas las PGRPs tienen un dominio amidasa en el extremo C-terminal, que es el que interactúa con el peptidoglicano. En su mecanismo de acción interactúan con el peptidoglicano o con la membrana externa y activan el sistema de dos componentes CpxA-CpxR, el cual induce la despolarización de la membrana y la producción de radicales libres. Las PGRPs están conservadas de invertebrados hasta vertebrados. Al contrario que los receptores Nod, las PGRPs de mamíferos se unen a peptidoglicano macromolecular (Boudreau *et al.*, 2012).

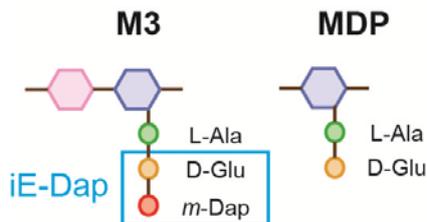


Figura 8. Estructura de los muropéptidos M3 y MDP, activadores de los receptores Nod. Abreviaturas: M3, monómero disacárido tripeptídico activador de Nod1. En el recuadro azul se señala el dipéptido iE-Dap (D-Glu-*m*-Dap), estructura mínima capaz de activar el receptor Nod1; MDP, monómero dipeptídico, activador de Nod2.

B.5 El peptidoglicano en otras bacterias que producen infección intracelular

La información existente sobre metabolismo del peptidoglicano y su influencia en el estilo de vida de bacterias que causan infección intracelular es bastante escasa. En el caso de *Brucella abortus*, se ha descrito una proteína con actividad muramidasa (SagA) que tiene un papel importante en los primeros pasos de la replicación intracelular dentro de fagocitos y que evita la fusión de la BCV ("*Brucella-Containing Vacuole*") con lisosomas (Del Giudice *et al.*, 2013). SagA está, además, involucrada en el ensamblaje del sistema VirB (sistema de secreción de proteínas tipo IV) y el fenotipo observado durante los primeros pasos de la replicación intracelular podría ser consecuencia de un ensamblaje incorrecto de este sistema.

Durante décadas se ha especulado sobre la presencia de peptidoglicano en las especies de *Chlamydia*, patógenos intracelulares obligados con dimorfismo en su ciclo celular. La forma infectiva del organismo es el cuerpo elemental (EB-"*Elementary Body*") inerte metabólicamente. Tras la infección de la célula hospedadora, el EB sufre una transición al cuerpo reticulado (RB-"*Reticulate Body*") metabólicamente activo, que se replica pero que es incapaz de infectar otras células hospedadoras, por lo que este RB debe volver a diferenciarse en el EB. Estudios recientes han demostrado la existencia de peptidoglicano funcional en estas bacterias (Liechti *et al.*, 2014). La mayoría del peptidoglicano identificado por anticuerpos anti-proteínas de membrana externa se localiza en el septo de los RBs en división, aunque no se puede descartar que haya niveles bajos de marcaje de peptidoglicano en otra parte de la bacteria, lo que indica la necesidad de peptidoglicano antes de la división celular. Estudios posteriores, identificaron la amidasa AmiA conservada dentro del género *Chlamydia* (Klößner *et al.*, 2014), la cual es capaz de utilizar peptidoglicano macromolecular y lípido II monomérico como sustratos *in vitro*. Además, AmiA de *Chlamydia* se comporta como una amidasa y una DD-CPasa. De todas las proteínas implicadas en el metabolismo del peptidoglicano en *E. coli*, sólo AmiA, PBP 2, PBP 3 y PBP 6 están descritas en *Chlamydia*. En este género no se han identificado hasta el momento ni TGs ni EPasas.

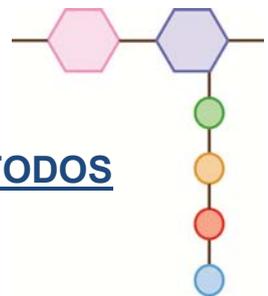
OBJETIVOS



El objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue el estudio de los procesos de biosíntesis, modificación, hidrólisis y reciclaje del peptidoglicano de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en el interior de fibroblastos, tipo celular en el que este patógeno intracelular establece un estado de persistencia. Se caracterizaron también modificaciones en la estructura del peptidoglicano de la bacteria intracelular, apoyándonos en un modelo de evasión de reconocimiento por la célula infectada. En este contexto, se fijaron los siguientes objetivos concretos:

1. Identificar y clasificar las enzimas de *S. Typhimurium* implicadas en la biosíntesis, modificación, hidrólisis y reciclaje del peptidoglicano mediante un análisis genómico realizado *in silico*.
2. Estudiar, a nivel de proteína, el perfil de expresión de cada una de las enzimas implicadas en el metabolismo del peptidoglicano en bacteria crecida en distintos medios de cultivo y en aquella obtenida del interior de células eucariotas, tanto de fibroblastos como de células epiteliales.
3. Realizar un estudio funcional de las enzimas del peptidoglicano en la infección de células eucariotas mediante la construcción, en *S. Typhimurium*, de mutantes sencillos y múltiples con deficiencias en enzimas con la misma actividad o en enzimas cuya producción estuviera aumentada en bacteria intracelular.
4. Determinar la estructura del peptidoglicano de *S. Typhimurium* en el interior de fibroblastos en un estado de no proliferación.
5. Estudiar la actividad y la regulación de la enzima STM1940, anotada en bases de datos como “hidrolasa de la pared celular”, con presencia selectiva en bacterias del género *Salmonella* e inducida en bacteria intracelular.

MATERIALES Y MÉTODOS



A. Material biológico

A.1 Estirpes bacterianas y plásmidos

Las estirpes de *S. Typhimurium* y *E. coli* así como los plásmidos empleados en este estudio se describen en las **Tablas A1, A2 y A3** del anexo I.

A.2 Bacteriófagos

Como bacteriófago transductor se utilizó P22 HT105/1 *int201* (Schmieger, 1972).

A.3 Anticuerpos

Los anticuerpos primarios empleados en los ensayos de detección de proteínas fueron los siguientes:

Monoclonal de ratón anti-FLAG (clon M2, Sigma), dilución 1:5000.

Monoclonal de ratón anti-6xHis (Clontech), dilución 1:5000.

Policlonal de conejo anti-IgA (Cano *et al.*, 2002), dilución 1:10000.

Policlonal de conejo anti-OmpA (Pucciarelli *et al.*, 2002), dilución 1:50000.

Monoclonal de ratón anti-DnaK (clon 8E2/2, Enzo), dilución 1:10000.

Policlonal de conejo anti-PBP2, dilución 1:200.

Policlonal de conejo anti-PBP3, dilución 1:1000.

Los anticuerpos anti-PBP 2 y anti-PBP 3 se obtuvieron durante el desarrollo de este trabajo.

Como anticuerpos secundarios se emplearon:

Policlonal de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Bio-Rad), dilución 1:5000.

Policlonal de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Bio-Rad), dilución 1:5000.

A.4 Líneas celulares eucariotas

Las líneas celulares empleadas fueron:

NRK-49F: fibroblastos de riñón de rata ("*Normal Rat Kidney Fibroblasts*") (ATCC CRL-1570).

BJ-5ta: fibroblastos de prepucio humano (ATCC CRL-4001).

HeLa: células epiteliales de carcinoma cervical humano (ATCC CCL-2).

B. Medios y condiciones de cultivo

B.1 Cultivo de bacterias

Las bacterias se crecieron normalmente en el medio rico en nutrientes de Luria y Bertani (LB) (Maloy, 1990). Su composición es de 10 g/l de peptona, 5 g/l de extracto de levadura, y 5 g/l de NaCl. Para el crecimiento en medio sólido se añadió agar a una concentración de 15 g/l. Según

requerimiento, los medios fueron suplementados con kanamicina (30 µg/ml), cloranfenicol (10 µg/ml), ampicilina (50 µg/ml) o tetraciclina (10 µg/ml).

El medio SOC ("*Super Optimal broth with Catabolite repression*") (Hanahan, 1983) es un medio enriquecido que se empleó para el crecimiento óptimo de la bacteria tras la electroporación de ácidos nucleicos. Este medio SOC se compone de 2 % (p/v) bacto-triptona, 0,5 % (p/v) extracto de levadura, 10 mM NaCl, 0,25 mM KCl, 10 mM MgCl₂ y 20 mM glucosa. Este medio se tamponó a pH 7,0 con una solución 5 M NaOH.

El medio ISM ("*Intracellular Salts Medium*") se empleó para el cultivo de las bacterias en un ambiente similar al del citoplasma de las células eucariotas (Headley & Payne, 1990). Su composición es de 170 mM K₃PO₄, 0,5 mM MgSO₄, 1 µM CaCl₂, 6 mM K₂SO₄, 5 mM NaCl, 5 mM NH₄Cl y 2 µg/ml ácido nicotínico. La fuente de carbono es glicerol 38 mM. Este medio se tamponó a pH 7,0 con ácido ortofosfórico.

El medio PCN ("*Phosphate-Carbon-Nitrogen*") es un medio mínimo que se empleó para el cultivo de las bacterias en un ambiente similar al de la vacuola que contiene *Salmonella* tras la infección. Este medio se compone de 80 mM MES (pH 5,8 o pH 7,4), 4 mM Tricina, 100 µM FeCl₃, 376 µM K₂SO₄, 50 mM NaCl, 0,4 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 0,4 % glucosa, 15 mM NH₄Cl, 1 mM MgSO₄, 10 µM CaCl₂, además de micronutrientes. Estos micronutrientes incluyen: 10 nM Na₂MoO₄, 10 nM NaSeO₃, 4 nM H₃BO₃, 300 nM CoCl₂, 100 nM CuSO₄, 800 nM MnCl₂ y 1 nM ZnSO₄.

Para la preparación del caldo de fagos P22 se empleó el medio NB ("*Nutrient Broth*") (Difco) suplementado con NaCl y sales E. Para la composición final del medio NB, se añadieron 8 g/l de NB (3 g/l de extracto de carne y 5 g/l de peptona) y 5 g/l de NaCl. Las sales E (Vogel & Bonner, 1956) se prepararon cincuenta veces más concentradas (38 mM MgSO₄, 0,5 M ácido cítrico, 3,75 M K₂HPO₄ y 0,83 M NaNH₄HPO₄) y se esterilizaron con cloroformo. El caldo de fagos se preparó mezclando 100 ml de NB, 2 ml de sales E 50x, 1 ml de glucosa al 20 % y 0,1 ml de un lisado de fagos obtenido desde una estirpe silvestre.

El medio EBU ("*Evans-Blue Uranine*") (Isaacson *et al.*, 1999) se utilizó para comprobar el estado de lisogenia de las cepas obtenidas en ensayos de transducción. Está compuesto de medio LB al que se le añadieron por cada 100 ml: 0,5 ml de glucosa al 50 % (p/v), 1 ml de K₂HPO₄ al 25 % (p/v), 125 µl de azul de Evans al 1 % (p/v) y 250 µl de fluoresceína (uranina) al 1 % (p/v).

Para los lavados del sedimento de bacteria obtenido por centrifugación se empleó fosfato salino tamponado (PBS) 1x, pH 7,4 compuesto por 2 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl y 137 mM NaCl.

Los cultivos de bacterias se incubaron normalmente a 37°C con una agitación suave (160-175 rpm), con una relación matraz:volumen de cultivo de 10:1.

Para los ensayos de infección de células eucariotas, los cultivos de *S. Typhimurium* se incubaron a 37°C sin agitación durante 18 h, con una relación matraz:volumen de cultivo 5:1. De este modo, se favorece la motilidad de la bacteria y, como consecuencia, su contacto con la célula eucariota.

B.2 Cultivo de células eucariotas

Los fibroblastos NRK-49F y BJ-5ta se cultivaron en Medio de Eagle modificado por Dulbecco, (DMEM) (Invitrogen). Para los fibroblastos NRK-49F, el medio fue suplementado con 5 % (v/v) de suero fetal bovino (SFB) (Invitrogen) y 4 mM de L-glutamina (Invitrogen). En el caso de los fibroblastos humanos BJ-5ta, el medio fue suplementado con 10 % (v/v) de SFB, 4 mM de L-glutamina y 10 ml de “Medium 199” (Sigma) a un volumen final de 500 ml. Para el cultivo de las células epiteliales HeLa se empleó Medio Mínimo de Eagle (MEM) (Invitrogen) que fue suplementado con 10 % (v/v) de SFB, 2 mM de L-glutamina, 1x de aminoácidos no esenciales (NEAA, “*Non Essential Amino Acids*”, Invitrogen) y 1 mM de piruvato sódico (Invitrogen).

Todas las líneas celulares se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5 % de CO₂. Para su propagación, las células se despegaban de la superficie de las placas de Petri (Falcon/Nunc) añadiendo 0,5 % de tripsina-EDTA (Invitrogen) e incubando durante 5 min a 37°C. Una vez despegadas, se diluían en su medio de cultivo habitual hasta conseguir la dilución adecuada en cada caso.

Las líneas celulares fueron congeladas en criotubos (Nunc) dentro de nitrógeno líquido (aprox. -170°C). Cada una de las líneas se congeló en el medio de cultivo correspondiente con un 10 % (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma). Para su descongelación, el criotubo se sumergía en un baño de agua a 37°C. A continuación, todo su contenido se vertía sobre placas de Petri (Falcon/Nunc) y se incubaban en condiciones normales. Una vez las células estaban adheridas al soporte, el medio de cultivo con DMSO era sustituido por medio de cultivo fresco.

Para los lavados de los cultivos de células eucariotas tras la infección, se empleó PBS completo 1x pH 7,4, compuesto por PBS 1x suplementado con 0,9 mM CaCl₂ y 0,5 mM MgCl₂.

C. Genética bacteriana

C.1 Inactivación de genes cromosómicos de *S. Typhimurium* SV5015

Se empleó el método de Datsenko y Wanner de inactivación de genes cromosómicos “en un solo paso” (Datsenko & Wanner, 2000). En este método se sustituye la región codificante del gen de interés por un casete de resistencia a kanamicina (Km). En los casos en los que el gen a inactivar estaba dentro de un operón, se sustituyó el operón completo por el casete de Km. Los oligonucleótidos empleados para la inactivación de genes cromosómicos se muestran en la **Tabla A4** del anexo I. Como DNA molde para la amplificación de los casetes de resistencia antibiótica se emplearon los plásmidos pKD13 y pKD4. El plásmido pKD46 se utilizó para la expresión de la recombinasa. Estos plásmidos están descritos en la **Tabla A3** del anexo I.

La sustitución del gen de interés por el casete de resistencia antibiótica se confirmaba mediante PCR (“*Polymerase Chain Reaction*”) empleando los oligonucleótidos descritos en la **Tabla A5** del anexo I. En cada caso, se comprobaba que los niveles de expresión de los genes adyacentes al gen o genes delecionados eran similares a los de la estirpe silvestre mediante RT-PCR (“*Retrotranscriptase-Polymerase Chain Reaction*”) semi-cuantitativa. Para ello se empleaba el kit comercial “One-Step RT-PCR” (Qiagen) y los oligonucleótidos descritos en la **Tabla A6** del anexo I. Para todos los casos se empleó el gen *ompA* como control de carga, DNA genómico (DNAg) como control positivo de amplificación y H₂O como control negativo.

En aquellos casos en los que fue necesario, se utilizó el plásmido pCP20 (**Tabla A3** del anexo I) para retirar el casete de resistencia antibiótica. Este plásmido codifica la recombinasa FLP que elimina el casete mediante la recombinación de los sitios FRT que lo flanquean, dejando en su lugar 80 pares de bases (pb) de la secuencia FRT (Cherepanov & Wackernagel, 1995).

C.2 Etiquetado de genes cromosómicos de *S. Typhimurium* SV5015

Se siguió el protocolo de etiquetado de genes cromosómicos descrito en *Salmonella* (Uzzau *et al.*, 2001). Para ello se utilizó el plásmido pSUB11 como DNA molde (**Tabla A3** del anexo I) y los oligonucleótidos descritos en la **Tabla A7** del anexo I.

C.3 Etiquetado de genes cromosómicos basado en la utilización del plásmido pKO3 Blue

Para la construcción de determinadas estirpes etiquetadas se utilizó el protocolo descrito por Solano y colaboradores (Solano *et al.*, 2009). Este protocolo permite modificar secuencias génicas sin dejar restos de la secuencia FRT. Para etiquetar el gen de interés con la secuencia del epítipo FLAG, se diseñaron oligonucleótidos que contenían secuencias homólogas al gen de interés así como la secuencia del epítipo FLAG. Los oligonucleótidos empleados en este método se muestran en la **Tabla A7** del anexo I.

C.4 Electroporación de ácidos nucleicos en *S. Typhimurium* y *E. coli*

Para la obtención de células electrocompetentes de *S. Typhimurium* se partió de un cultivo de bacteria crecido durante 18 h a una densidad óptica de $\sim 3,0$ a 600 nm (DO_{600}). Se hizo una dilución 1:100 de este cultivo en 25 ml de medio LB y se incubaron las bacterias a 30°C o 37°C (según las características de la estirpe) en agitación hasta que la DO_{600} del cultivo alcanzó valores de 0,5-0,6. Todas las centrifugaciones de las bacterias se realizaron a 15557 x g (10000 rpm), 4 min, 4°C. Las bacterias se resuspendieron primero con 20 ml de H₂O MilliQ y a continuación con 10 ml, tras ésto con 10 ml de glicerol 10 % (v/v) y finalmente con 500 μ l de glicerol 10 % (v/v). Para el paso de electroporación, se mezclaron 300 μ l de células electrocompetentes con 500 ng de DNA en una cubeta de electroporación de 0,2 cm (Bio-Rad) previamente enfriada (todo el proceso se realizó en hielo). Seguidamente, la mezcla fue sometida a un pulso de 12,5 kV/cm (2,5 kV, 200 Ω y 25 μ F). La bacteria se recuperó de este proceso añadiendo a la cubeta 1 ml de medio SOC previamente precalentado a 37°C. Esta mezcla se transfirió a un tubo estéril que se incubó a 30°C o 37°C, según la estirpe, y que se mantuvo en agitación durante 2-3 h. Tras la incubación, se sembraron 500 μ l de la mezcla en un medio selectivo con antibiótico.

Para la obtención de células electrocompetentes de *E. coli* se partió de cultivos en los que la dilución fue de 1:50 en 50 ml de LB. En este caso, también se mantuvo el cultivo en agitación hasta una DO_{600} de 0,5-0,6. Para preparar células electrocompetentes, las centrifugaciones fueron a 6300 x g, 10 min, 4°C. Las bacterias se resuspendieron dos veces con 50 ml de H₂O MilliQ, después con 20 ml de glicerol al 10 % (v/v) y finalmente con 1 ml de glicerol al 10 % (v/v). En este caso, se electroporaron 50 μ l de células electrocompetentes con 100 ng de DNA. Las condiciones de electroporación fueron las descritas anteriormente.

En caso de requerir un mayor volumen de células electrocompetentes, los volúmenes indicados previamente se aumentaron de manera proporcional.

C.5 Preparación de lisados de bacteriófagos P22

Los lisados se prepararon mezclando 4 ml de caldo P22 con 1 ml de cultivo de la estirpe donadora crecido unas 18 h a 37°C en agitación (175 rpm). Esta mezcla se incubó durante 8 h a 37°C y agitación suave (100 rpm). Los bacteriófagos se recogieron centrifugando el lisado a 3220 x g, 20 min, Ta. El sobrenadante se recogió en un tubo Falcon (15 ml) al que se le añadieron 100 µl de cloroformo para su esterilización y se agitó vigorosamente. Los lisados se almacenaron a 4°C.

C.6 Transducción en medio líquido

Se empleó el bacteriófago P22 para la transferencia mediante transducción y recombinación homóloga de alelos portando marcadores cromosómicos. Para ello, se mezclaron 200 µl de un cultivo de la estirpe receptora, crecido unas 18 h a 37°C en agitación, con 200 µl del lisado P22 de la estirpe donadora. Después de 30 min, a 37°C y en agitación suave (100 rpm), esta mezcla se sembró en placas de LB-agar en medio selectivo para el marcador utilizado y se incubaron a 37°C hasta la aparición de transductantes.

Para comprobar que los transductantes estaban libres de bacteriófagos (Chan *et al.*, 1972), se sembraron cinco colonias en placas de medio EBU. Se considera que un transductante está limpio de bacteriófago cuando en el aislamiento todas las colonias son claras y no aparece ninguna colonia de color azul oscuro. Esta diferencia de color se debe al viraje del compuesto indicador, ya que, las colonias de pseudolisógenos se acidifican (azul oscuro) debido a la lisis.

D. Manipulación de ácidos nucleicos

D.1 Extracción de DNA genómico

Para la extracción de DNA genómico se partió de 1,5 ml de cultivo de bacterias crecido en LB en fase estacionaria (aprox. a una DO_{600} de 3,0 equivalente a $\sim 10^{10}$ bacterias/ml). Las células se recogieron por centrifugación (14100 x g, 5 min, Ta) y se resuspendieron en 560 µl de tampón TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM Na_2EDTA , pH 8,0). Tras añadir 30 µl de 10 % (p/v) SDS y 3 µl de Proteinasa K (20 mg/ml), la mezcla se incubó 1 h a 37°C para lisar las células. Posteriormente, se añadieron 100 µl de 5 M NaCl y 80 µl de CTAB/NaCl (10 % (p/v) bromuro de cetil-trimetil amonio/ 0,7 M NaCl) previamente calentado a 65°C, para eliminar los restos bacterianos. Para purificar el DNA se añadieron 700 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), separándose por centrifugación (20000 x g, 5 min, 4°C). Las fases superior e intermedia se recogieron y se centrifugaron de nuevo en las mismas condiciones. El sobrenadante se pasó a un tubo limpio y el DNA fue precipitado con etanol absoluto frío en una proporción 1:2 (v/v). Se lavó con etanol al 70 % (v/v) y se secó al aire. Finalmente, el DNA genómico se resuspendió en 150 µl de agua estéril. La cantidad y calidad del DNA fue medida en el espectrofotómetro "NanoDrop" modelo "ND-1000" (Thermo Scientific). Las muestras se conservaron a -20°C.

D.2 Extracción de DNA plasmídico

La extracción de DNA plasmídico se realizó utilizando el kit comercial "QIAprep Spin Miniprep Kit" (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

D.3 Extracción de RNA

Para la extracción de RNA de *S. Typhimurium*, se crecieron las estirpes correspondientes en medio LB y se recogieron los cultivos en la fase exponencial del crecimiento ($DO_{600} \sim 0,2$). El volumen de cultivo correspondiente a 1 unidad de DO_{600} (aprox. 10^9 bacterias) se transfirió a un tubo que contenía una mezcla de fenol/etanol a una concentración final 5/95 % (v/v) respectivamente (McDowall *et al.*, 1994). Tras una incubación en hielo de 30 min, las bacterias se recogieron por centrifugación ($3220 \times g$, 10 min, $4^\circ C$) y se procesaron con el kit “RNeasy Mini Kit” (Qiagen). Finalmente, con el RNA bacteriano obtenido se realizó un tratamiento con “TURBO DNA-free Kit” (Ambion) para eliminar los posibles restos de DNA genómico de la muestra.

D.4 Digestión y ligación de fragmentos de DNA

En este trabajo se emplearon las endonucleasas de restricción DpnI, XhoI, NcoI y NdeI, todas de New England Biolabs, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para las reacciones de ligación de fragmentos de DNA se utilizó la ligasa T4 de New England Biolabs. La mezcla de ligación se incubó durante 18 h a $16^\circ C$. Posteriormente, se purificó la ligación con el kit “Pellet Paint NF Co-precipitant” (Novagen).

D.5 Clonación de genes de *S. Typhimurium* SV5015

En este trabajo se han clonado los genes que codifican las proteínas PBP 2, PBP 3 y STM1940 empleando como estirpe hospedadora *E. coli* BL21(DE3) (**Tabla A2** del anexo I). Los genes *mrdA* (PBP 2) y *ftsI* (PBP 3) se clonaron en el plásmido pET24d(+) mientras que *STM1940* se clonó en el plásmido pET22b(+) (**Tabla A3** del anexo I). Estos plásmidos tienen una secuencia correspondiente a una etiqueta 6xHis para fusionarla con el gen de interés. Los oligonucleótidos empleados para la construcción de estos clonajes y su posterior comprobación se muestran en las **tablas A8** y **A9** del anexo I, respectivamente.

D.6 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

Las muestras de DNA se analizaron por electroforesis en geles en el rango del 1-2 % (p/v) de agarosa (según el tamaño del DNA) al que se le añadió el producto de tinción de ácidos nucleicos GelRed (1x) (Biotium). Las muestras se sometieron a electroforesis con un voltaje entre 90-110 V. Como marcadores se utilizaron las escaleras de DNA de 1 kb o de 100 pb (Promega), según el tamaño del DNA de interés.

D.7 Aislamiento de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de DNA se extrajeron cortando la zona del gel de agarosa marcada con el agente de tinción en el tamaño correspondiente a la muestra. Los fragmentos de gel con la muestra fueron purificados con el kit “illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante.

D.8 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada para la construcción de estirpes mutantes se empleó la polimerasa “Expand High Fidelity” (EHF) (3500 U/ml) (Roche). Por otro lado, se empleó la polimerasa Taq Gold (5000U/ml) (Roche) para los análisis de PCR “comunes”. A la polimerasa correspondiente se añadió el DNA molde y una mezcla de

desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs: dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador “MyCycler thermal cycler” (Bio-Rad), siendo el programa más empleado: i) 10 min a 94°C; ii) 30 ciclos de: 15 s a 94°C, 30 s a 55°C y 1 min a 72°C; y, iii) 5 min a 72°C.

D.9 Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa (RT-PCR)

Para comprobar que los niveles de expresión de los genes adyacentes al gen o genes delecionados eran similares a los de la estirpe silvestre se empleó la reacción de PCR con transcriptasa reversa (RT-PCR) semi-cuantitativa. Para ello, se utilizó el kit comercial “One-Step RT-PCR” (Qiagen). Este kit contiene una combinación de enzimas, transcriptasas y polimerasas, que permiten la realización de la transcripción reversa y de la PCR en la misma reacción. El kit contiene: la enzima, una mezcla de dNTPs a una concentración 10 mM, el tampón 5x y el H₂O libre de RNasas. Tras mezclar estos compuestos, se añadieron los oligonucleótidos (0,6 µM) (Sigma), inhibidor de RNasas (5U) (Promega) y RNA (10-100 ng/µl). Las reacciones de RT-PCR semi-cuantitativa se realizaron en el termociclador “MyCycler thermal cycler” (Bio-Rad), siendo el programa más empleado: i) 30 min a 50°C; ii) 15 min a 95°C; iii) 26 ciclos de: 30 s a 94°C, 30 s a 55°C y 1 min a 72°C; y, iv) 5 min a 72°C.

E. Secuenciación

E.1 Secuenciación de DNA

Los fragmentos de DNA se secuenciaron por el Servicio de Secuenciación del Parque Científico de Madrid (<http://www.fpcm.es>) o por la empresa STABvida (www.stabvida.com).

E.2 Análisis y comparación de secuencias

El análisis informático de las secuencias de nucleótidos se realizó utilizando el paquete de análisis de DNASTAR Inc.

F. Microscopía

Para la observación de la morfología de las estirpes analizadas a lo largo de este estudio se empleó el microscopio invertido “DMI 6000B” (Leica) con un controlador HS automático “CTR/7000” (Leica Microsystems) y una cámara “CCD Orca-R2” (Hamamatsu Photonics) utilizando el objetivo 63x con contraste de fase.

F.1 Tapizado de lentillas con Poli-L-Lisina

Para tapizar las lentillas a las que fijar las bacterias, se preparó poli-L-Lisina (Sigma) a una concentración final de 0,01 % (p/v) en H₂O MilliQ. Se añadieron 50 µl de dicha disolución para cubrir por completo la superficie de cada lentilla y se incubaron durante 5 min a Ta. Se retiró la solución lo máximo posible y las lentillas se guardaron para su uso.

F.2 Fijación de las bacterias de medio de cultivo

Para la observación de la morfología celular, las bacterias se fijaron y se depositaron posteriormente en lentillas con poli-L-lisina. Para ello, las bacterias se centrifugaron (5400 x g, 2 min, Ta) y se hizo un lavado con 500 µl de PBS. El sedimento bacteriano se resuspendió con 200 µl de paraformaldehído (PFA) al 3 % (p/v) y se incubó durante 15 min a Ta. Se diluyó el PFA al 1 % con PBS y las muestras se guardaron a 4°C.

Para el procesamiento de estas muestras para el análisis microscópico, las bacterias se centrifugaron (5400 x g, 2 min, Ta) y se lavaron con 500 µl de PBS. El sedimento se resuspendió con 300 µl o 150 µl de PBS según las bacterias se hubieran obtenido de un cultivo en fase de crecimiento estacionaria o exponencial, respectivamente. Se agregaron 50 µl de suspensión bacteriana a cada lentilla y se incubaron durante 15 min a Ta. A continuación, se retiró la suspensión y se hicieron tres lavados con 50 µl de PBS. Se dejaron secar las lentillas y posteriormente se montaron en un portaobjetos con ProLong Gold Antifade (Molecular Probes) y se sellaron con esmalte de uñas.

G. Infección de cultivos celulares con *S. Typhimurium*

G.1 Determinación de la tasa de invasión e índice de proliferación intracelular

Para los ensayos de infección, las bacterias se cultivaron en medio LB a 37°C, durante 18 h y sin agitación. Los fibroblastos (~10⁵ células/pocillo) se sembraron en placas de 24 pocillos (Falcon) en DMEM y se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada y 5 % de CO₂. Después de 24 h, cuando el cultivo había alcanzado una confluencia del 50-60 %, las células eucariotas se infectaron con la cepa correspondiente de *S. Typhimurium* a una multiplicidad de infección (MOI) de 10:1 (bacteria:célula eucariota). El número de bacterias viables del inóculo fue calculado sembrando diluciones seriadas en placas de LB-agar y contando el número de unidades formadoras de colonias (ufc). Tras 20 min de infección, se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células eucariotas dos veces con PBS 1x pH 7,4 estéril a 37°C. Seguidamente, se añadió medio de cultivo nuevo a 37°C suplementado con 100 µg/ml de gentamicina (Sigma). A las 2 h post-infección (hpi) se volvió a añadir medio nuevo, esta vez conteniendo 10 µg/ml de gentamicina. Este antibiótico sólo elimina las bacterias extracelulares sin afectar a la viabilidad de aquellas que se encuentran en el interior de las células eucariotas (Finlay & Falkow, 1988). A las 2, 24 y 48 hpi, las células eucariotas infectadas se lavaron tres veces con la solución salina equilibrada de Hank (HBSS, Invitrogen) y se lisaron con una solución estéril compuesta por 1 % (v/v) Tritón X-100 y 0,1 % SDS (p/v) en PBS durante 5 min a 37°C. El número de bacterias intracelulares viables se determinó sembrando distintas diluciones del lisado de células infectadas en placas de LB-agar y contando el número de ufc. Para cada estirpe y tiempo se infectaron dos pocillos y el lisado de cada pocillo se sembró por duplicado. La tasa de invasión se calculó como el número de bacterias intracelulares viables a 2 hpi con respecto al número de bacterias viables inoculadas. El índice de proliferación intracelular (Ipro) se calculó como el cociente entre el número de las bacterias intracelulares viables a las 24 hpi/48 hpi con respecto a las 2 hpi. Se realizaron, al menos, tres experimentos independientes (réplicas biológicas) para cada estirpe.

En otro tipo de ensayos, a los que denominamos “ensayos de gota”, se realiza una infección igual a la descrita anteriormente excepto en el plaqueo del lisado. En este caso, se colocan, ordenadamente en cada placa, gotas de 10 µl de las diluciones correspondientes de cada estirpe. Estos ensayos facilitan el escrutinio inicial del comportamiento de los mutantes ya que una inspección directa del número de colonias obtenido en las gotas de distintas diluciones permite comprobar si hay fenotipo con respecto a la estirpe silvestre.

G.2 Obtención de bacteria intracelular en ensayos de infección de células eucariotas

Para la obtención de bacterias intracelulares se optimizó el protocolo descrito para la infección de macrófagos J774.A1 con *S. Typhimurium* (Eriksson *et al.*, 2003). Se sembraron

alrededor de $2,5 \times 10^7$ fibroblastos o células epiteliales en placas de cultivo de 500 cm^2 de superficie (Nunc) y un volumen de cultivo de 50 ml, a 37°C en una atmósfera humidificada y con un 5 % de CO_2 . El número de placas empleado se ajustó según el tipo celular utilizado en el experimento. Para la infección de células epiteliales HeLa, donde *S. Typhimurium* prolifera hasta las 14 hpi (Martínez-Moya *et al.*, 1998), se emplearon dos placas de 500 cm^2 . En el caso de fibroblastos BJ-5ta, en los que la mayoría de la población bacteriana intracelular mantiene un estado no proliferativo, se emplearon seis placas de 500 cm^2 . En las infecciones de fibroblastos NRK-49F se empleaban cuatro placas de 500 cm^2 por muestra.

Tras 24-48 h posterior a la siembra, cuando el cultivo alcanzaba un 80-90 % de confluencia ($\sim 4,9 \times 10^7$ células), los fibroblastos o células epiteliales se infectaban con las estirpes correspondientes de *S. Typhimurium* durante 40 min. Tras esta incubación, las células se lavaban tres veces con 20 ml de PBS completo 1x, añadiéndose 30 ml de medio fresco con $100 \mu\text{g/ml}$ de gentamicina (Sigma), todo ello precalentado a 37°C . A las 2 hpi, se reemplazó el medio con 50 ml de medio fresco conteniendo gentamicina $10 \mu\text{g/ml}$. A los tiempos post-infección establecidos para cada experimento (14 hpi para células epiteliales HeLa y 24 hpi para los fibroblastos BJ-5ta y NRK-49F), los cultivos se lavaban cinco veces con 20 ml de PBS completo 1x y se lisaban con 12 ml de solución de lisis. Esta solución contiene: 1 % (v/v) de fenol básico (Amresco), 19 % (v/v) de etanol (Merck) y 0,4 % (p/v) de SDS (Sigma). Para cada placa, se añadieron además, $1,2 \mu\text{l}$ de Dnasa (10 mg/ml) (Roche). Se incubaron las placas 30 min a 4°C y a continuación se recuperó el volumen a tubos de polipropileno de 40 ml (Sorvall), donde se centrifugó ($25000 \times g$, 60 min, 4°C) para la obtención de las bacterias intracelulares. Tras retirar el sobrenadante, el sedimento de bacteria intracelular se lavó utilizando 1 ml de solución de lavado de composición: 1 % (v/v) de fenol básico (Amresco) y 19 % (v/v) de etanol (Merck), y se sometió a una posterior centrifugación ($29400 \times g$, 15 min, 4°C). El sedimento de bacteria intracelular se conservó a -80°C .

H. Modelo de infección *in vivo*

H.1 Ensayo de índice de competición en ratones BALB/c

Para los ensayos de índice de competición se utilizó el protocolo descrito por Beuzón y Holden (Beuzón & Holden, 2001). Se infectaron ratones hembra de la línea BALB/c de entre 6 y 8 semanas de vida. Estos ensayos se realizaron inoculando por vía intraperitoneal (i.p) o por vía oral con una mezcla de cantidades iguales de la estirpe silvestre (wt) y la estirpe problema (X), usando por cada mezcla un total de cuatro (i.p) o seis (oral) ratones. Las estirpes bacterianas se crecieron en medio LB a 37°C y sin agitación durante 18 h. Las bacterias se sedimentaron por centrifugación ($20000 \times g$, 5 min, 4°C) y se lavaron una vez con PBS frío. A cada uno de los ratones inoculados por vía intraperitoneal se les inyectaron $200 \mu\text{l}$ de PBS conteniendo 10^4 bacterias. Para la administración oral, los ratones eran inoculados con $25 \mu\text{l}$ de una mezcla 1:1 de las estirpes parental y mutante ($12,5 \mu\text{l}$ de cada suspensión) en una solución de lactosa al 0,1 % y con una cantidad total de $\sim 5 \times 10^8$ bacterias. Los ratones sometidos a administración oral del patógeno se mantuvieron en ayuno de agua durante las 18 h previas a la infección. Transcurridas 48 h (ensayos i.p) o cinco días (ensayos oral) de la infección, los animales se sacrificaron por asfixia con CO_2 de acuerdo con el protocolo del servicio del animalario del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). Tras el sacrificio de los animales se extrajeron el hígado y el bazo, los cuales se procesaron para cuantificar las bacterias como ufc. Las estirpes problema se distinguen de la silvestre por un marcador de resistencia a antibiótico.

El índice de competición (IC) se determinó tanto en hígado como en bazo usando la siguiente fórmula:

$$IC = \frac{\text{bacteria en \acute{o}rgano} = (X/wt)}{\text{mezcla inoculación} = (X/wt)}$$

IC = índice de competición
X = ufc estirpe problema
wt = ufc estirpe silvestre

I. Preparación de extractos de proteínas

I.1 Proteínas totales de *S. Typhimurium* crecida en medios de cultivo

Las bacterias se crecieron en diversos medios de cultivo (LB, PCN pH 5,8, PCN pH 7,4 e ISM) a 37°C hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento ($DO_{600} \sim 3$ para LB o ~ 2 para los medios mínimos limitantes en nutrientes) o la fase exponencial ($DO_{600} \sim 0,2$). Se recogió 1 unidad de DO_{600} (equivalente a 10^9 bacterias) mediante centrifugación (15000 x g, 10 min, 4°C), resuspendiendo el sedimento en 75 μ l de PBS y añadiendo posteriormente 25 μ l de tampón Laemmli 4x (concentración final: 1,3 % (p/v) SDS, 10 % (v/v) glicerol, 50 mM Tris-HCl, 1,8 % (v/v) β -mercaptoetanol, 0,02 % (p/v) azul de bromofenol, pH 6,8). Las muestras se hirvieron durante 5 min y se centrifugaron (14100 x g, 5 min, Ta) para retirar restos de peptidoglicano y DNA. En los geles de poliacrilamida se cargaron 10 μ l/pocillo de estas muestras (10^8 bacterias/pocillo). Los remanentes de las muestras se conservaron a -20°C.

I.2 Proteínas totales de *Salmonella* intracelular

Las muestras conteniendo bacteria intracelular obtenida de cuatro placas de 500 cm² de superficie (Nunc) se resuspendieron en PBS y posteriormente se añadió tampón Laemmli 4x hasta un volumen final de 32 μ l. Las muestras se hirvieron durante 30 min, agitando vigorosamente cada 10 min, para ser sometidas posteriormente a centrifugación (14100 x g, 5 min, Ta). En los geles de poliacrilamida se cargaron ~ 10 μ l/pocillo del sobrenadante ($\sim 10^8$ bacterias/pocillo). Como control de carga se detectó la proteína de membrana interna IgaA.

I.3 Fraccionamiento de extracto de bacterias

En los estudios de localización subcelular de la proteína STM1940 se realizó el fraccionamiento del extracto de bacteria en membrana externa, interna y citoplasma. Se recogieron 10^9 bacterias de un cultivo (14100 x g, 5 min, 4°C) en el medio y la fase de crecimiento óptimo para la expresión de STM1940 y se resuspendieron en 500 μ l de PBS. Estas bacterias se rompieron sonicando 3 veces en periodos de 20 s dejando reposar en hielo durante 40 s entre pulsos de sonicación. La muestra sonicada se centrifugó (4000 x g, 5 min, 4°C) para tirar las células no rotas, paso que se repetía dos veces para evitar la presencia de restos de células no rotas en las muestras de citoplasma y membranas externa e interna. A continuación, el sobrenadante se centrifugó (29400 x g, 20 min, 4 °C), conteniendo el sobrenadante resultante la fracción de citoplasma. En el sedimento se acumuló el material de membrana. Tras añadir 100 μ l de PBS 1 % (v/v) Triton X-100 (Merck), la muestra se incubó en una noria durante 3 h a 4°C. A continuación, se centrifugó (29400 x g, 20 min, 4°C), obteniéndose en el sedimento material enriquecido en membrana externa y en el sobrenadante material enriquecido en proteínas de la membrana interna ya solubilizada con el detergente. Como proteínas controles de cada una de las

fracciones se detectaron: DnaK (citoplasma), IgaA (membrana interna) y OmpA (membrana externa) (Cano *et al.*, 2002; Pucciarelli *et al.*, 2002).

J. Inmunodetección de proteínas (ensayos de “Western”)

Para los ensayos de Western, las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles del 8-12 % de poliacrilamida-glicina-SDS y tampón Tris-glicina-SDS. Se utilizó para la electroforesis el equipo “Mini-protean 3 Cell” (Bio-Rad) y una fuente “Power-Pac” (Bio-Rad). A continuación, las proteínas se transfirieron a membranas de polivinilideno difluorado (PDVF, Immobilon-P, Millipore) humedecidas en metanol y equilibradas en 48 mM Tris-HCl, 39 mM glicina, 0,036 % (p/v) SDS y 20 % (v/v) metanol a pH 8,5. La transferencia se realizó en un aparato “Trans-Blot Turbo Transfer System” (Bio-Rad) durante 30 min a 25 V. Una vez terminada la transferencia, las membranas se bloquearon con un 3 % (p/v) de leche desnatada diluida en TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween-20) durante al menos 1 h a Ta en agitación. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario diluido en BSA con azida sódica (3 % (p/v) BSA, 1 mM NaN₃ en PBS 1x) a 4°C durante un mínimo de 18 h. Después de tres lavados de 5 min cada uno con TBS-T, las membranas se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario diluido en TBS-T. La posición y cantidad relativa de las proteínas reconocidas por los anticuerpos se detectaron mediante el ensayo de quimioluminiscencia basado en la reacción cumárico-luminol (Iwata *et al.*, 1995).

K. Purificación de proteínas

K.1 Producción de las proteínas STM1940::6xHis, PBP 2::6xHis y PBP 3::6xHis desde plásmido

Para la inducción de los genes *STM1940*, *STM1910* y *STM1836* clonados en los plásmidos pET22b(+) o pET24d(+) se utilizó IPTG. Los cultivos crecidos durante toda la noche a 37°C en agitación (175 rpm) se diluyeron 1:100 a la mañana siguiente, incubándose en las mismas condiciones hasta una DO₆₀₀~0,6. En este momento, se añadió 1mM IPTG, manteniéndose la inducción durante 90 min.

K.2 Purificación de STM1940::6xHis mediante columna de afinidad

Para la purificación de STM1940::6xHis mediante columna de afinidad se empleó la resina “TALON Metal Affinity Resin” (Clontech). Antes de unir la proteína, se equilibraron 1,5 ml de la resina en un tubo de 15 ml tipo Falcon con tampón de lavado (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl). Para ello, se rellenó el tubo hasta 14 ml y se centrifugó (700 x g, 3 min, 4°C) repitiéndolo tres veces. A continuación, se añadió la proteína y se incubó en agitación rotatoria durante 24 h a 4°C. Para empaquetar la resina se pasó todo el volumen anterior por una columna “Econo-column” (Bio-Rad). A continuación, se realizó un lavado con 20 ml de una solución conteniendo: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl. Para eluir proteínas inespecíficas se hizo un lavado con 10 ml del mismo tampón anterior al que se le añadió 20 mM imidazol. Finalmente, la proteína STM1940::6xHis fue eluida con 10 ml (recoger de 1 ml en 1 ml) del mismo tampón conteniendo 300 mM imidazol. Las proteínas purificadas se guardaron a 4°C.

K.3 Actividad de la proteína STM1940::6xHis sobre muropéptidos purificados y sobre peptidoglicano total

Los muropéptidos purificados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y empleados en estos ensayos fueron: i) los monómeros M3 (NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap), M3G (NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-Gly), M4 (NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-D-Ala), y M5 (NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-D-Ala-D-Ala); y, ii) los dímeros D34D (NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-*m*-Dap-(D-Ala)-D-Glu-L-Ala-NAcMur-NAcGlc), D44 (NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-D-Ala-*m*-Dap-(D-Ala)-D-Glu-L-Ala-NAcMur-NAcGlc), D44G (NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-D-Ala-*m*-Dap-(D-Ala-Gly)-D-Glu-L-Ala-NAcMur-NAcGlc) y D43 (NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-D-Ala-*m*-Dap-D-Glu-L-Ala-NAcMur-NAcGlc). Se incubaron 24-28 nmoles de cada uno de los muropéptidos con 16 µg de la proteína STM1940::6xHis en un tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0, 300 mM NaCl incubándose a 37°C. Se recogieron muestras a tiempo 0, 1,5 y 3 h. La reacción se paró hirviendo las muestras durante 10 min, las cuales se clarificaron posteriormente por centrifugación (14100 x g, 10 min, Ta). Los productos de la reacción se analizaron mediante HPLC.

En los ensayos de la proteína sobre peptidoglicano macromolecular (sáculos), el material correspondiente a 5×10^{10} bacterias se incubó con 100 µg de STM1940::6xHis en tampón 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl a 37°C durante 18 h. El peptidoglicano así tratado se digirió posteriormente con muramidasa, analizándose el contenido de muropéptidos mediante HPLC.

L. Análisis estructural del peptidoglicano

L.1 Purificación de peptidoglicano de *S. Typhimurium* crecida en medios de cultivo

Para obtener peptidoglicano de bacteria extracelular se partió de 50 U de cultivo ($\sim 5 \times 10^{10}$ bacterias) a la DO_{600} deseada, bien fase estacionaria o fase exponencial de crecimiento. Las bacterias se sedimentaron mediante centrifugación (12900 x g, 10 min, 4°C), lavándose posteriormente con 20 ml de PBS y resuspendiéndose en un volumen final de 3 ml de PBS. Estos 3 ml se añadieron gota a gota a un mismo volumen al 8 % (p/v) de SDS hirviendo y en continua agitación. La solución resultante se hirvió durante 8 h en continua agitación y se dejó sólo con agitación durante 18 h más a Ta. Este proceso es importante para romper ácidos nucleicos, en especial DNA cromosómico, que podrían contaminar la muestra de peptidoglicano. La sedimentación de peptidoglicano se realizó mediante centrifugación de alta velocidad (346200 x g, 20 min, 23°C) en una ultracentrífuga "Optima MAX-UP" (Beckman Coulter). El peptidoglicano se lavó con 2,5 ml de H₂O MilliQ caliente por un mínimo de tres veces con el fin de retirar restos de SDS. A continuación, el peptidoglicano se resuspendió en 500 µl de tampón α-amilasa (10 mM Tris-HCl, 0,06 % NaCl, pH 7,6) al que se le agregó la enzima α-amilasa (Sigma) a 100 µg/ml, incubándose la muestra durante 90 min a 37°C. En este paso se eliminaban posibles oligosacáridos y polisacáridos que pudieran quedar retenidos junto al sáculo. Posteriormente, se añadió pronasa-E (Sigma) a 100 µg/ml y previamente tratada durante 60 min a 60°C para inactivar la posible lisozima contaminante de muestras comerciales. La incubación con pronasa-E se hacía durante 60 min a 60°C para eliminar la lipoproteína unida al sáculo. Esta reacción de proteólisis se paró añadiendo 200 µl de SDS al 8 % (p/v) e hirviendo durante 20 min. El peptidoglicano macromolecular resultante (sáculos) se obtenía posteriormente mediante centrifugaciones y

lavados realizados en las mismas condiciones indicadas anteriormente para el peptidoglicano no tratado enzimáticamente.

L.2 Purificación de peptidoglicano de *S. Typhimurium* intracelular

Para la obtención de peptidoglicano de bacteria intracelular, partimos de una muestra de bacteria de *S. Typhimurium* *phoP7953::Tn10* procedente de la infección de 144 placas de cultivo de 500 cm² de superficie (Nunc) o de 180 placas de 500 cm² en el caso de la muestra de la estirpe silvestre *S. Typhimurium* SV5015, todas estas placas conteniendo fibroblastos humanos BJ-5ta. Se empleó un volumen de 3 ml de PBS para la resuspensión de este sedimento, que se puso a hervir, gota a gota, con agitación vigorosa durante 8 h en el mismo volumen de 8 % (p/v) SDS y se continuó agitando sin calor durante 18 h más. El peptidoglicano se recuperó mediante ultracentrifugación (346200 x g, 20 min, 23°C) en una ultracentrífuga "Optima MAX-UP" (Beckman Coulter), lavándose posteriormente con 2,5 ml de H₂O MilliQ caliente. Este peptidoglicano se incubó con 1 µg de tripsina (Promega) durante 5 h, a 37°C y en agitación. La tripsina es una endopeptidasa que hidroliza el enlace establecido entre el peptidoglicano y las lipoproteínas ya que esta enzima posee afección por residuos de Lys y Arg, que son los residuos terminales de la lipoproteína de Braun (Lpp). En este protocolo, dada la escasez de material procedente de bacteria intracelular, se obvió el tratamiento con α-amilasa. La incubación con tripsina en lugar de pronasa-E también ahorra pasos de centrifugación al no necesitarse añadir SDS para parar la reacción de proteólisis. El peptidoglicano tratado con tripsina se recuperaba, finalmente, por centrifugación en las mismas condiciones que el peptidoglicano inicial no tratado enzimáticamente.

L.3 Obtención de muropéptidos para análisis cromatográfico

Los muropéptidos fueron obtenidos del peptidoglicano macromolecular (sáculo) tras la digestión con N-acetil-muramidasa. Para ello, se resuspendía el peptidoglicano obtenido tanto de bacteria crecida en medio de cultivo como de bacteria intracelular en 500 µl de tampón muramidasa (tampón fosfato potásico 50 mM pH 4,9) al que se agregaban 100 µg/ml de la N-acetil-muramidasa denominada Cellosyl (cedida por Hoescht), incubándose durante 18 h a 37°C. Esta reacción enzimática se paraba hirviendo la muestra durante 2 min y posterior centrifugación (14100 x g, 10 min, Ta) para eliminar restos insolubles. El sobrenadante, es decir, los muropéptidos solubles producto de la digestión, se mezclaron con 1/3 del volumen de tampón borato sódico 0,5 M y se redujeron con un exceso de NaBH₄ (10 mg/ml). En este paso de reducción, que tiene lugar durante 30 min a Ta, el NAcMur se reduce a N-acetilmuramitol, evitando así su anomerización. El pH de la muestra se ajustó a 3,0 con ácido ortofosfórico para parar la reacción de reducción. Todas las muestras se filtraron (filtros Millex-GV; 0,22 µm- 2,5 mm) para eliminar impurezas y se almacenaron a -20°C.

L.4 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La separación de muropéptidos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC- "*High Performance Liquid Chromatography*") se realizó basándose en el método de [Glauner et al. \(1988\)](#). Para ello, se utilizó un sistema de bombeo 325 system (Kontron Instruments) conectado a un detector "Jasco UV-1570" que monitorizaba los muropéptidos eluidos midiendo la absorbancia a 204 nm. La columna (Tecnokroma) del equipo era de fase reversa Hypersil ODS 3 µm de tamaño de partícula con dimensiones 35/0,46. El flujo de los eluyentes fue a 0,5 ml/min y con una temperatura de la columna de 35°C. La elución de los muropéptidos se realizó en tres etapas:

i) 7 min en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 4,35 con 0,005 % (p/v) de azida sódica (tampón A); ii) un gradiente lineal de 70 min en tampón fosfato de sodio 75 mM pH 4,95 (tampón B) con 15 % de metanol (v/v); iii) elución isocrática con metanol 60 % (v/v) de 30 min. Los cromatogramas fueron recogidos en un programa "Biocrom 2000 v.3.0" para el análisis de integración de las áreas de cada uno de los picos obtenidos. En los casos necesarios, se recogieron picos individuales, se secaron y se almacenaron a -20°C.

L.5 Cálculo del grado de entrecruzamiento y de la longitud de cadena de la estructura del peptidoglicano

En los cromatogramas obtenidos mediante HPLC de la estructura del peptidoglicano se pueden identificar muropeptidos que sean monómeros, dímeros o trímeros. El tiempo de retención de los mismos varía según el número de aminoácidos de sus cadenas peptídicas, el tipo de enlace establecido entre las cadenas peptídicas adyacentes, si tienen o no un grupo anhídrido en el extremo de la cadena glucídica o si están unidos a lipoproteína. Gracias a la identificación de cada muropeptido, se pueden calcular dos parámetros importantes de la estructura del peptidoglicano: el grado de entrecruzamiento y la longitud de cadena. El grado de entrecruzamiento se calcula sumando el porcentaje de moléculas de dímeros más el porcentaje de moléculas de trímeros, éste último multiplicado por dos porque presenta dos enlaces peptídicos. La longitud media de las cadenas se calcula gracias a la identificación de muropeptidos con grupos anhídrido en el extremo de las cadenas glucídicas dividiendo 100 entre el porcentaje de moléculas de grupos anhídrido.

M. Anticuerpos

M.1 Producción de anticuerpos en conejo

Tras el clonaje en el plásmido pET24d(+) de los genes de *S. Typhimurium* SV5015 que codifican PBP 2 y PBP 3, con un epítipo 6xHis en el extremo 3', se indujo su expresión en un volumen de cultivo de 400 ml de LB con IPTG (1 mM) a 30°C durante 90 min. La bacteria obtenida mediante centrifugación (15557 x g, 10 min, 4°C) se rompió mediante "French press" (Thermo Scientific) usando un mínimo de 4 pases de todo el volumen a una presión de 1000 psi. Las bacterias no rotas se eliminaron por centrifugación (15557 x g, 10 min, 4°C). Para la purificación de la proteína a utilizar como inmunógeno se empleó la resina "TALON Metal Affinity Resin" (Clontech). Se equilibraron 3 ml de resina con solución de lavado (50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, pH 7,0) mediante tres centrifugaciones sucesivas (700 x g, 3 min, 4°C). Para una unión eficiente de la proteína recombinante a la resina se realizó una incubación en agitación rotatoria a 4°C durante 2 horas. A continuación, se sedimentó la resina (a la que ya se había unido la proteína) mediante centrifugación (700 x g, 5 min, 4°C) y se lavó tres veces con solución de lavado. Con el fin de eliminar uniones inespecíficas de proteínas a la resina, en el tercer lavado se añadió 20 mM imidazol. Para la elución de la proteína de la resina, se añadió 1 ml de 300 mM imidazol, incubándose en agitación rotatoria a 4°C durante 5 min y sometiendo la resina a posterior centrifugación. De este modo se obtuvieron dos eluidos, E1 y E2. Los eluidos E3, E4, E5 y E6 se obtuvieron con 150 mM imidazol. Todos los eluidos se guardaron a 4°C. Para la selección de los eluidos con una mayor concentración de proteína, se cargaron 5 µl de cada uno de ellos en un gel del 10 % de tris-glicina que se tiñó con azul de coomassie (1 h a Ta). Las muestras con una mayor cantidad de proteína se concentraron mediante un filtro (Amicon-Millipore), centrifugando a 3220 x g, 15 min, 22°C, hasta que el volumen se reducía a ~125 µl. Las muestras se guardaron a

4°C. Estas muestras se cargaron en un gel (8 % tris-glicina) de “pocillo único”. Este gel se tiñó con azul de coomassie y se cortó la banda donde estaba la proteína de interés, identificada por su abundancia y su peso molecular. Mediante el empleo de un émbolo, se trituró el gel con la proteína añadiendo 50 µl de PBS y se almacenó a 4°C hasta su envío. La empresa Charles River fue la encargada de la inmunización de los conejos y de la extracción y envíos periódicos de los sueros.

M.2 Purificación de los sueros de conejo

Puesto que ocasionalmente los sueros policlonales detectan muchas proteínas inespecíficas, se hizo una purificación de éstos para reducir en la medida de lo posible este efecto. Para ello, se obtuvo proteína procedente de la inducción de 600 ml de LB mediante el mismo protocolo indicado en el apartado anterior (**M.1**). Se juntaron los eluidos con una mayor concentración de proteína y se dializaron frente a una solución 100 mM MOPS pH 7,5 a 4°C durante 18 h en agitación.

En este caso, se utilizó la resina “Affi-Gel 10” (Bio-Rad). Se utilizó 1 ml de resina resuspendida con isopropanol que fue equilibrada con H₂O mediante centrifugación (2900 x g, 1 min, 4°C). Se pusieron en contacto la resina y la proteína y se incubaron en agitación rotatoria a 4°C durante 4 h. Tras este tiempo, se añadieron 100 µl de etanolamina 1M HCl pH 8,0, se agitó y se dejó otra hora a 4°C en agitación rotatoria. Con este paso se bloqueaba cualquier sitio de unión reactivo que quedara libre en la resina. La resina así tratada se empaquetó en columnas “Econo-column” (Bio-Rad). Se lavó la columna con 10 ml MOPS 100 mM pH 7,5, 10 ml PBS 1x, 10 ml Tris-glicina HCl 100 mM pH 2,4 y 150 mM NaCl y, finalmente, con otros 10 ml de PBS 1x. Se purificaron 15 ml de suero de conejo a través de esta columna. Para ello, el sobrenadante obtenido tras una centrifugación del suero (15557 x g, 10 min, 4°C) se pasó tres veces por la columna. Se realizó un lavado de la resina con 10 ml de PBS 1x y se eluyó el anticuerpo con Tris-glicina HCl 100 mM pH 2,4 y 150 mM de NaCl. Se recogieron diez fracciones de 1 ml sobre 200 µl de Tris-HCl 1M pH 8,0 (para neutralizar el tampón del anticuerpo). Antes de almacenar la columna, se realizó un lavado con 10 ml de PBS 1x, uno con 10 ml de Tris-glicina HCl 100 mM pH 2,4 y 150 mM NaCl y, finalmente, con otros 10 ml de PBS 1x. La columna se conservó a 4°C en PBS 1x con azida sódica al 0,2 % (p/v).

N. Análisis estadístico

El análisis estadístico de todos los datos obtenidos en este trabajo se realizó con el programa “GraphPad Prism” (GraphPad Inc.). A los valores normalizados de los experimentos se aplicó o bien el test estadístico ANOVA de una vía con un post-test de Tukey, post-test de Dunnett o post-test de Bonferroni, o bien un test t de Student.

RESULTADOS



CAPÍTULO 1

Análisis *in silico* de la maquinaria enzimática empleada en la biosíntesis, modificación, hidrólisis y reciclaje del peptidoglicano de *S. enterica* serovar Typhimurium

Las bacterias emplean un gran número de enzimas en la biosíntesis, modificación, hidrólisis y reciclaje del peptidoglicano.

Numerosos estudios *in silico* han demostrado que estas enzimas tienen secuencias conservadas tanto en dominios catalíticos como no catalíticos. Este tipo de análisis muestra, por ejemplo, la existencia de hidrolasas del peptidoglicano con una especificidad catalítica concreta (van Heijenoort, 2011). Una característica de la maquinaria enzimática del peptidoglicano es la presencia de varias enzimas que muestran especificidad sobre un mismo enlace. Variaciones en la diversidad de dominios no catalíticos y, en algunos casos, la ausencia de péptidos señal, sugiere que estas enzimas podrían diferir en la regulación y/o localización subcelular (citoplasma, periplasma) dentro de la bacteria. Dado que la expresión de los genes que codifican estas enzimas puede estar sometida a distinta regulación, es posible que, enzimas que aparentemente tienen especificidades catalíticas iguales, cumplan funciones distintas en la biología o patogenicidad de una bacteria dada (Humann & Lenz, 2009).

1.1 Clasificación de proteínas con posible actividad enzimática sobre el peptidoglicano de *S. Typhimurium*

En este trabajo hemos estudiado un total de cuarenta y ocho genes de *S. Typhimurium* cuyos productos podrían tener una actividad enzimática dada dentro del metabolismo del peptidoglicano. Según su posible actividad enzimática, los clasificamos en cuatro grupos: biosíntesis (BIO), modificación (MOD), hidrólisis (HID) y reciclaje (REC) (Tabla 1, Fig. 4). Estos genes fueron identificados utilizando como referencia para la búsqueda (“*query*”) la secuencia aminoacídica de todas aquellas proteínas de la estirpe MG1655 de *E. coli* K-12 (código de acceso del genoma NC_000913.3) anotadas como relacionadas con metabolismo del peptidoglicano. Las secuencias de estas proteínas fueron volcadas sobre el proteoma teórico de la estirpe SL1344 de *S. Typhimurium* (código de acceso del genoma NC_016810.1). Sólo aquellas proteínas de *S. Typhimurium* SL1344 que mostraban más de un 85 % de identidad a las proteínas de *E. coli* K-12 MG1655 se consideraron como ortólogos.

Las enzimas de *S. Typhimurium* SL1344 clasificadas en el grupo “BIO” incluyen las PBPs de alto peso molecular (HMW-“*High Molecular Weight*”) con actividad transglicosilasa (TG) y/o DD-transpeptidasa (DD-TP) así como las LD-transpeptidasas (LD-TP) insensibles a penicilina. Dentro del grupo “MOD” se encuentran las PBPs de bajo peso molecular (LMW-“*Low Molecular Weight*”) así como otras enzimas insensibles a penicilina. Todas ellas tienen actividad peptidasa, endopeptidasa (EPasa) y/o carboxipeptidasa (CPasa), y se encargan de cortar los enlaces peptídicos según su especificidad en peptidoglicano total, muropéptidos o precursores. Las enzimas de este grupo se encargan de la remodelación del peptidoglicano a lo largo del ciclo celular de la bacteria, con el fin de permitir la incorporación de nuevas moléculas durante el crecimiento celular. Por otro lado, en el grupo “HID” agrupamos enzimas con actividad catalítica, tanto transglicosilasas líticas (TLs) como amidasas (Ami), las cuales no sólo son útiles para el recambio de peptidoglicano sino también para la incorporación de material nuevo. En el último grupo, “REC”, incluimos tanto proteínas transmembrana, como AmpG, como las enzimas citoplasmáticas AmpD, NagZ, LdcA, Mpl e YcjI.

Tabla 1. Clasificación de proteínas de *S. Typhimurium* con posible actividad enzimática sobre el peptidoglicano

Grupo ^(*)	Proteína	Gen	Actividad enzimática ^(**)
BIO	PBP 1A	<i>mrcA</i>	Transglicosilasa (TG)/Transpeptidasa (TP)
	PBP 1B	<i>mrcB</i>	TG/TP
	PBP 1C	<i>pbpC</i>	TG/TP
	PBP 2	<i>mrdA</i>	TP (elongación celular)
	PBP 2*	<i>STM1910</i>	PBP
	PBP 3	<i>ftsI</i>	TP (división celular)
	PBP 3*	<i>STM1836</i>	PBP
	MtgA	<i>mtgA</i>	TG
	ErfK	<i>erfK</i>	LD-transpeptidasa –Lipoproteína (LD-TP-Lpp)
	YbiS	<i>ybiS</i>	LD-TP-Lpp
	YcfS	<i>ycfS</i>	LD-TP-Lpp
	YcbB	<i>ycbB</i>	LD-TP- <i>m</i> -Dap- <i>m</i> -Dap
	YnhG	<i>ynhG</i>	LD-TP- <i>m</i> -Dap- <i>m</i> -Dap
	YafK	<i>yafK</i>	LD-TP
STM3277	<i>STM3277</i>	LD-TP	
MOD	PBP 4	<i>dacB</i>	DD-carboxipeptidasa (DD-CPasa)/DD-endopeptidasa (DD-EPasa)
	PBP 5	<i>dacA</i>	DD-CPasa
	PBP 6	<i>dacC</i>	DD-CPasa
	PBP 6B	<i>dacD</i>	DD-CPasa
	PBP 7	<i>pbpG</i>	DD-EPasa
	AmpH	<i>ampH</i>	DD-CPasa/DD-EPasa
	MepA	<i>mepA</i>	DD/LD-EPasa
	YdhO	<i>ydhO</i>	DD-EPasa
	Spr	<i>spr</i>	DD-EPasa/LD-CPasa
	NlpC	<i>nlpC</i>	DD-EPasa/DL-CPasa
	STM1940	<i>STM1940</i>	DL-CPasa/DL-EPasa
	YebA	<i>yebA</i>	DD-EPasa (LytM)
	YibP (EnvC)	<i>yibP</i>	DD-EPasa/Activador Ami (LytM)
	NlpD	<i>nlpD</i>	Activador Ami (LytM) (***)
YgeR	<i>STM3038</i>	Activador Ami (LytM) (***)	
HID	MltA	<i>mltA</i>	Transglicosilasa lítica (TL)
	MltB	<i>mltB</i>	TL
	MltC	<i>mltC</i>	TL
	MltD	<i>mltD</i>	TL
	EmtA (MltE)	<i>emtA</i>	TL
	MltF	<i>yfhD</i>	TL
	Slt	<i>slt</i>	TL soluble
	STM4217	<i>STM4217</i>	TL
	AmiA	<i>amiA</i>	Amidasa (Ami)
	AmiB	<i>amiB</i>	Ami
	AmiC	<i>amiC</i>	Ami
AmiD	<i>ybjR/amiD</i>	Ami	
REC	AmpG	<i>ampG</i>	Permeasa (translocación al citosol)
	AmpD	<i>ampD</i>	Ami
	NagZ	<i>nagZ</i>	β-hexosaminidasa
	LdcA	<i>ldcA</i>	LD-CPasa
	Mpl	<i>mpl</i>	Ligasa
	Ycjl (MpaA)	<i>ycjl</i>	DL-CPasa

(*) **BIO**: biosíntesis; **MOD**: modificación; **HID**: hidrólisis; **REC**: reciclaje. (**) Actividades referidas a las mostradas en las figuras 5, 6 y 7. **PBP**: “*Penicillin Binding Protein*”. (***) No se ha demostrado actividad directa sobre peptidoglicano sino regulación de enzimas del peptidoglicano.

1.2 Proteínas específicas de *S. Typhimurium* con posible actividad sobre el peptidoglicano

Nuestro análisis *in silico* puso de manifiesto que *S. Typhimurium* comparte con *E. coli* la gran mayoría de las enzimas relacionadas con el metabolismo del peptidoglicano. De los cuarenta y ocho genes listados en la **Tabla 1**, cinco de ellos fueron incluidos en el estudio aun no habiéndose encontrado un ortólogo con alto nivel de identidad en *E. coli* K-12 MG1655. Estos cinco genes son: *STM1836* (con 63 % de identidad al gen *ftsI* que codifica la PBP 3 en *E. coli*, por lo que lo denominamos PBP 3*); *STM1910* (con 64 % de identidad al gen *mrda* que codifica la PBP 2 en *E. coli*, por lo que lo denominamos PBP 2*); *STM1940* (*STM1940*); *STM3277* (*STM3277*); y, *STM4217* (*STM4217*). Las proteínas codificadas por estos genes comparten regiones de homología con dominios catalíticos con demostrada actividad sobre el peptidoglicano.

Las proteínas PBP 2, PBP 2*, PBP 3 y PBP 3* son indistinguibles a nivel de organización de los módulos catalíticos (**Fig. 9**). Esto se debe a que la PBP 3* y la PBP 2* de *S. Typhimurium* SL1344 tienen homología con la PBP 3 y la PBP 2, respectivamente (**Fig. 10A y 10B**). Además, estas PBP 3 y PBP 2 de *S. Typhimurium* tienen un 96 % de identidad con la PBP 3 y la PBP 2 de *E. coli*, respectivamente (**Figs. A1a y A1b** del anexo I). De interés, observamos que tanto la PBP 2* como la PBP 3* están codificadas en todos los genomas de las especies, serotipos y estirpes del género *Salmonella* secuenciados hasta el momento (**Fig. 11**).

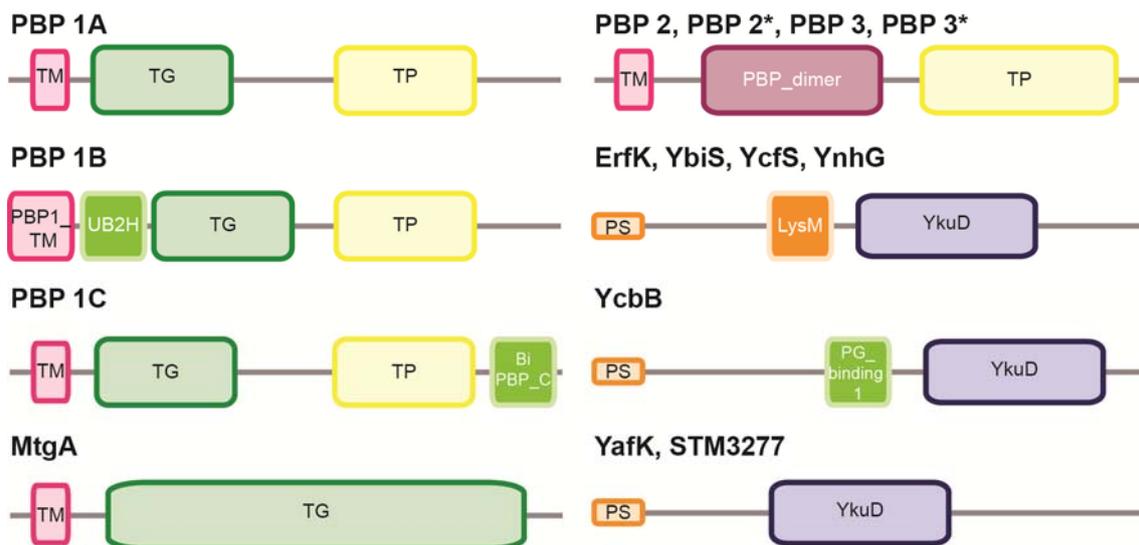


Figura 9. Dominios funcionales de las proteínas de *S. Typhimurium* asignadas al grupo de enzimas de biosíntesis (BIO) del peptidoglicano. Se muestran proteínas con actividad transglicosilasa (TG) y/o DD-transpeptidasa (TP): PBP 1A, PBP 1B, PBP 1C, MtgA, PBP 2, PBP 2*, PBP 3 y PBP 3*, así como proteínas con actividad LD-transpeptidasa (LD-TP) que comparten el dominio YkuD: ErfK, YbiS, YcfS, YnhG, YcbB, YafK y STM3277. Abreviaturas: BiPBP_C, "Penicillin-Binding Protein C-terminus family"; LysM, "lysine motif"; PG-binding 1, "Peptidoglycan Binding domain"; PS, péptido señal; TG, transglicosilasa; TM, región transmembrana; TP, transpeptidasa; UB2H, "binding component of PBP 1B".

```

PBP 3 ST      MKAAAKTQKSKRQEEQTNFISWRFALLCGCILLALVFLLGRAAWLQIIAPDMLVRQGDMSLRVQEVSTSRGMITDRSGRPLAVSVPVKAIWADPKEVHD 100
PBP 3* ST     -----MKKSDGDTRNFTPIRFALLCTAILLSMALLLGRVAWLQIVTPSKLVKQEDMRSLEVTTASPRGMITDREGRPLAVSVPVNAVWADPKTIIS 93
              *.* : : ** . ***** .***:.:****.*****:.* **.* ***** .:.******.*****:.*:***** : .

PBP 3 ST      AGGISVGDRWKALSTALNIPLDQLSARINANPKGRFIYLARQVNPDMADYIKKLLKPLGIHLREESRRYYPGSEVTAHLIGFTNVDSQGIEGVEKSFDKWL 200
PBP 3* ST     KGGVGYNERWQALASALHLSLSTLAERVNSNPAGRFIYLARQVSPQQAEWIDKLNLPGINLREESRRFYPAGHVAANLIGFTNIDGQGIEGIEKSFNAQL 193
              **: . .:***:***:***:.*. *: *:*:* ** *****.*: *:*.*.***:*****:***:*. *:*:*****:*.*****:***: *

PBP 3 ST      TGQPGERIVRKDRYGRVIEDISSTDSQAAHNLALSIDERLQALVYRELNNAVAFNKAESGSAVLVDVNTGEVLAMANSYSPNPNLAGTPKDAMRNRTIT 300
PBP 3* ST     TGKPGSRLVRKDKFGHVIENITEVNPVPAHELQLSIDERLQTVTEDALDNAVIVNKAESGAAVLINIPTGEILSMASYPDFNPNNREGAQLDDFRNRAIS 293
              **.*. *:*:***:***:***:.*. . .**.* *****:.. *:*.* :*****:***:.. **.*:***. *.*:*** * : * :***:*.

PBP 3 ST      DVFEPGSTVKPMVMTALQRGIVNENTVLNTPYRINGHEIKDVARYSELTLTGVLQKSSNVGVSKLALAMPSSALVDITYSRFGLGKATNLGLVGERSSGL 400
PBP 3* ST     DTFEPGSTVKPLVIMTALQQGIVQPDSVIDTHPFTLDGHRIRDVGYPPELTLTGILQKSSDTGVSHLSLAMPVQKLMDTYKSFQFGVPTGLGLTGESSGL 393
              *.*****:.*:*****:***: :*::* * : :**.*:*. *.*****:*****:***:*.***. *:*:***. **.* *.*:***.*** ** 312

PBP 3 ST      YPQQRWSDIERATFSFGYGLMVTPLQLARVYATIGSYGIYRPLSITKVDPPVGERIFPESTVRTVVHMESVALPGGGGVKAAIKGYRIAIAKTGTAKK 500
PBP 3* ST     LPKRRYWSDDLDRATFAFGYGLMVTPLQLAHVYATIGSFGIYRPLSITKVDPPVIGTRVMPPEELVHEVEHMESVALPGGGGTKAAVRDYRIAIAKTGTAKK 493
              *.:. : ***:.*:***:*****:*****:*****:***** * *:*.*. * : * *****.***:.*. *****

PBP 3 ST      VPGDGRYINKYIAYTAGVAPASQPRFALVVVINDPQAGKYYGGAVSAPVFGAIMGGVLRMTNIEPDALATGEKNEFVINQEGTGGRS 588
PBP 3* ST     IGDDGKYVDKYVAYTAGVAPASNPRFALVVVINNPQNGAYYGGAVSAPVFSQIMGDVLRLENVEPDGMPADSDHLLVMHGSHVAVPGS 581
              :* **.*:.*:***:*****:*****:*** * *****. ***.*** *:*:*. :.:. : : * 469
    
```

Figura 10A. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de PBP 3* (STM1836) con PBP3 (FtsI) de *S. Typhimurium* SL1344. Se muestra el alineamiento de la PBP 3 (FtsI) con la PBP 3* (STM1836) de *S. Typhimurium* SL1344. Nótese como la PBP 3* muestra un 65 % de identidad frente a la PBP 3. ST: *S. Typhimurium*.

Por su parte, STM3277 presenta el dominio YkuD (Pfam no. PF03734) con actividad LD-TP. Comparte este dominio con las enzimas ErfK, YbiS, YcfS, YcbB, YnhG y YafK (**Fig. 9**), presentes tanto en *E. coli* como en *S. Typhimurium*. En base a esta característica, clasificamos STM3277 dentro del grupo “BIO”. Curiosamente, el gen *STM3277* sólo está presente en algunos serovares de la especie *S. enterica* (**Fig. 11**).

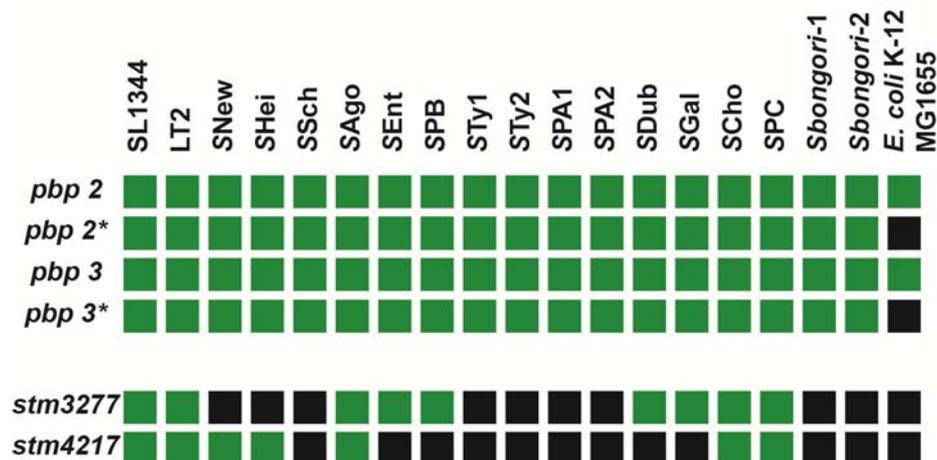


Figura 11. Distribución de los genes *mrdA* (*pbp 2*), *STM1910* (*pbp 2**), *ftsI* (*pbp 3*), *STM1836* (*pbp 3**), *STM3277* y *STM4217* dentro del género *Salmonella*. Se analizó mediante la herramienta BLASTn de NCBI la distribución de los genes *mrdA*, *STM1910* (*pbp 2**), *ftsI*, *STM1836* (*pbp 3**), *STM3277* y *STM4217* en los siguientes genomas: SL1344 (SL1344), *S. Typhimurium* LT2 (LT2), *S. Newport* SL254 (SNew), *S. Heidelberg* SL476 (SHei), *S. Schwarzengrund* CVM19633 (SSch), *S. Agona* SL483 (SAgo), *S. Enteritidis* P125109 (SEnt), *S. Paratyphi B* SP87 (SPB), *S. Typhi* CT18 (STy1), *S. Typhi* Ty2 (STy2), *S. Paratyphi A* ATCC9150 (SPA1), *S. Paratyphi A* AKU_12601 (SPA2), *S. Dublin* CT_02021853 (SDub), *S. Gallinarum* 287/91 (SGal), *S. Choleraesuis* SC-B67 (SCho), *S. Paratyphi C* RKS4594 (SPC), *S. bongori-1* N268-08 (Sbongori-1), *S. bongori-2* NCTC12419 (Sbongori-2) y *E. coli* K-12 MG1655. Verde: hay homólogos identificados; negro: no hay homólogos identificados.

STM1940 presenta el dominio NlpC_P60 (Pfam no. PF00877) con actividad EPasa, al igual que las proteínas YdhO, Spr y NlpC conservadas en *E. coli* y *S. Typhimurium* (**Fig. 12**). STM1940 fue incluida en el grupo “MOD” en base a esta característica. Un análisis de la región del genoma donde mapea *STM1940* muestra que los genes colindantes (*STM1939-STM1941*) están también ausente en el genoma de *E. coli* K-12 MG1655.

Al igual que *STM1940*, el gen *STM4217*, mapea en una región de varios genes todos ellos ausentes en *E. coli* K-12 MG1655. La proteína STM4217 tiene un dominio SLT (Pfam no. PF13406) compartido con el resto de Tls (**Fig. 13**), por lo que se ha clasificado como enzima del grupo “HID”. Nuestros análisis sobre este gen *STM4217* dieron resultados negativos a nivel de expresión en ensayos de RT-PCR, no pudiéndose tampoco identificar la proteína por Western. *STM4217* sólo está presente en *S. Typhimurium*, *S. Newport*, *S. Heidelberg*, *S. Agona*, *S. Choleraesuis* y *S. Paratyphi C* RKS4594 (**Fig. 11**). En base a estos datos, no nos fue posible determinar la posible función de *STM4217* relacionada con el metabolismo del peptidoglicano.

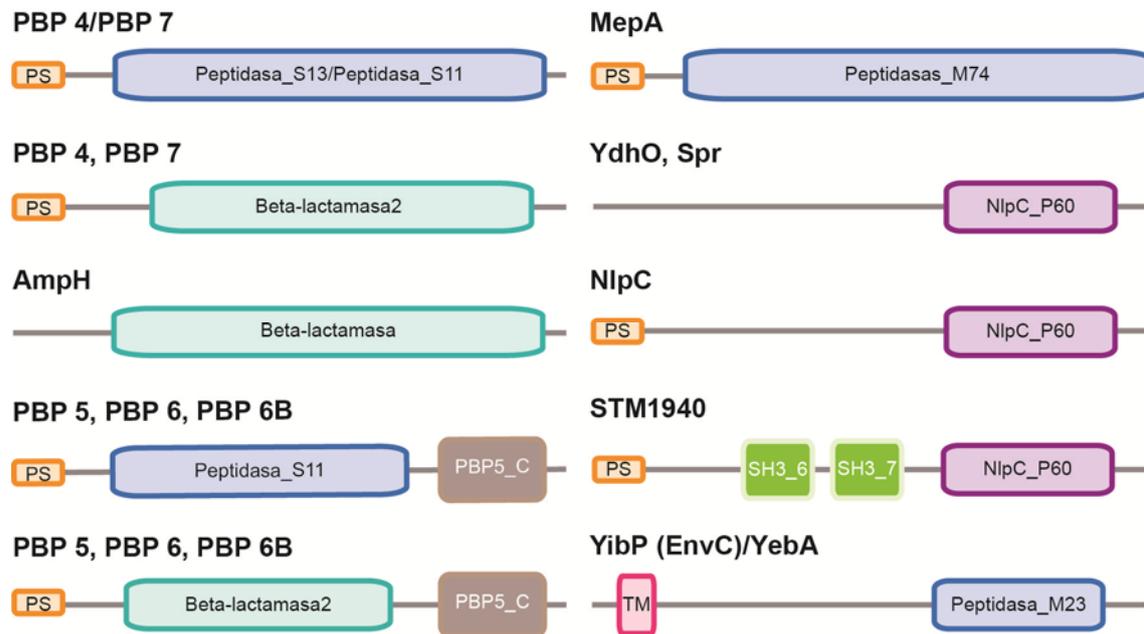


Figura 12. Dominios funcionales de las proteínas de *S. Typhimurium* asignadas al grupo de modificación (MOD) del peptidoglicano. Se muestran los dominios de las proteínas con actividad carboxipeptidasa (CPasa): PBP 4, PBP 5, PBP 6, PBP 6B, AmpH, Spr, NlpC y STM1940; y, endopeptidasa (EPasa): PBP 4, PBP 7, AmpH, MepA, YdhO, Spr, NlpC, STM1940, YibP (EnvC) y YebA. Abreviaturas: PBP5_C, "*Penicillin-Binding Protein 5, C-terminal domain*"; PS, péptido señal; SH3, "*Src Homology domain*"; TM, región transmembrana.

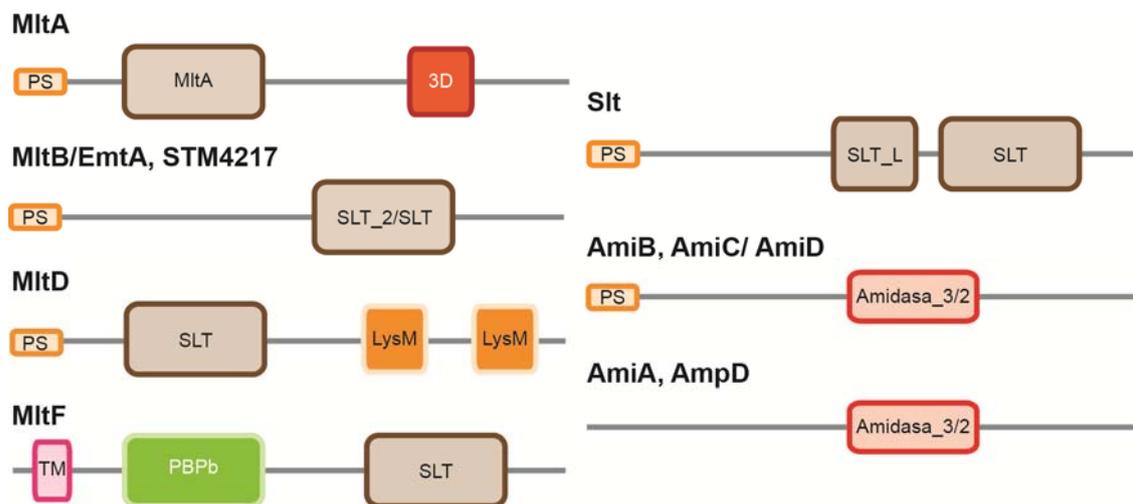


Figura 13. Dominios funcionales de las proteínas de *S. Typhimurium* asignadas al grupo de hidrólisis (HID) del peptidoglicano. Se representan los dominios de las proteínas con actividad transglicosilasa lítica (TL): MItA, MItB, MItC, EmtA, MItD, MItF, STM4217 y Slt; y, amidasa (Ami): AmiA, AmiB, AmiC, AmiD y AmpD. Abreviaturas: 3D, tres residuos de aspartato; LysM, "*lysin motif*"; MItA y SLT, dominios transglicosilasa; PBPb, "*bacterial periplasmic substrate-binding domain*"; PS, péptido señal; TM, región transmembrana.

CAPÍTULO 2

**Perfil de expresión de proteínas de
S. enterica serovar Typhimurium con
posible actividad en el metabolismo
del peptidoglicano**

Datos previos de nuestro laboratorio, obtenidos en el modelo de infección de células epiteliales HeLa, mostraban que *S. Typhimurium* modifica sustancialmente la estructura del peptidoglicano cuando la bacteria prolifera en el ambiente intracelular (Quintela *et al.*, 1997). Este fenómeno sugiere posibles cambios en la maquinaria enzimática que interviene en el metabolismo del peptidoglicano cuando el patógeno coloniza la célula eucariota. Nuestro interés se centró, además, en caracterizar posibles cambios en los niveles de las enzimas implicadas en el modelo de infección de fibroblastos, caracterizado por vez primera en nuestro laboratorio y en el cual, *S. Typhimurium* establece un estado de persistencia en el interior de la célula infectada (Cano *et al.*, 2001).

La aproximación experimental elegida fue la de etiquetar en el cromosoma el extremo 3' de todos y cada uno de los genes identificados *in silico* en el genoma de *S. Typhimurium* SL1344 como codificantes de enzimas con posible actividad en el peptidoglicano. La etiqueta utilizada fue el epítipo 3xFLAG (Uzzau *et al.*, 2001), fácilmente detectable mediante Western. Este abordaje nos permitiría evaluar los niveles de expresión de cada enzima tanto en bacterias crecidas en distintos medios de laboratorio como en aquellas aisladas del interior del fibroblasto. Se etiquetaron un total de treinta y cuatro genes, construyéndose además, estirpes portando el epítipo 3xFLAG en varios genes, lo cual facilitaba la detección simultánea de varias enzimas (Tabla 2, Tabla A10).

Tabla 2. Estirpes “multi-etiqueta” de *S. Typhimurium* construidas en este trabajo

Estirpe	Genotipo
1	<i>mrcA::3xFLAG dacB::3xFLAG dacA::3xFLAG STM1910::3xFLAG ampH::3xFLAG-kan</i>
2	<i>mrcB::3xFLAG dacC::3xFLAG STM1836::3xFLAG pbpG::3xFLAG-kan</i>
3	<i>mepA::3xFLAG dacD::3xFLAG mltF::3xFLAG mltB::3xFLAG-kan</i>
4	<i>slt::3xFLAG ldcA::3xFLAG amiC::3xFLAG mltA::3xFLAG-kan</i>
5	<i>emtA::3xFLAG mltD::3xFLAG mltC::3xFLAG ybiS::3xFLAG-kan</i>
6	<i>nagZ::3xFLAG mtgA::3xFLAG STM1940::3xFLAG-kan</i>
7	<i>erfK::3xFLAG ycfS::3xFLAG ycbB::3xFLAG ynhG::3xFLAG-kan</i>
8	<i>mpl::3xFLAG nlpC::3xFLAG spr::3xFLAG-kan</i>

2.1 Etiquetado de genes de *S. Typhimurium* que codifican enzimas con actividad en el peptidoglicano

Dentro de nuestro estudio se identificaron cuarenta y ocho genes que codifican proteínas con demostrada o posible actividad en el metabolismo del peptidoglicano. No obstante, el análisis de la región del genoma donde mapean estos genes indicó que, en algunos casos, no era factible la inserción de la etiqueta 3xFLAG sin alterar el orden génico de la región. Así, descartamos el etiquetado en casos en los que el gen a etiquetar mapea dentro de un operón o solapa con los genes adyacentes, bien en la misma orientación o bien en orientaciones opuestas. En cualquiera de estas tres situaciones, una etiqueta en el extremo 3' del gen en estudio afectaría la transcripción de los genes corriente abajo del gen problema.

Debido a la complejidad de los experimentos que implican el aislamiento en el fibroblasto de bacterias intracelulares en fase de no crecimiento activo y por tanto, con necesidad de infección de un número elevado de fibroblastos, se construyeron hasta un total de ocho estirpes en las que

se combinaron, en cada una de ellas, hasta cinco proteínas etiquetadas diferenciables en gel por su peso molecular (**Fig. 14, Tabla 2**). Estas ocho estirpes mostrarían información sobre la producción de hasta un total de treinta y una proteínas. En total se etiquetaron treinta y cuatro proteínas pero dos de ellas (STM4217 y PBP 1C) no se detectan mediante ensayos de Western, a pesar de haber verificado que la secuencia del gen etiquetado y de la región promotora eran correctas. Otra excepción fue YdhO, la cual se estudió de forma individual ya que se identificó posteriormente a la construcción de las estirpes “multi-etiqueta”.

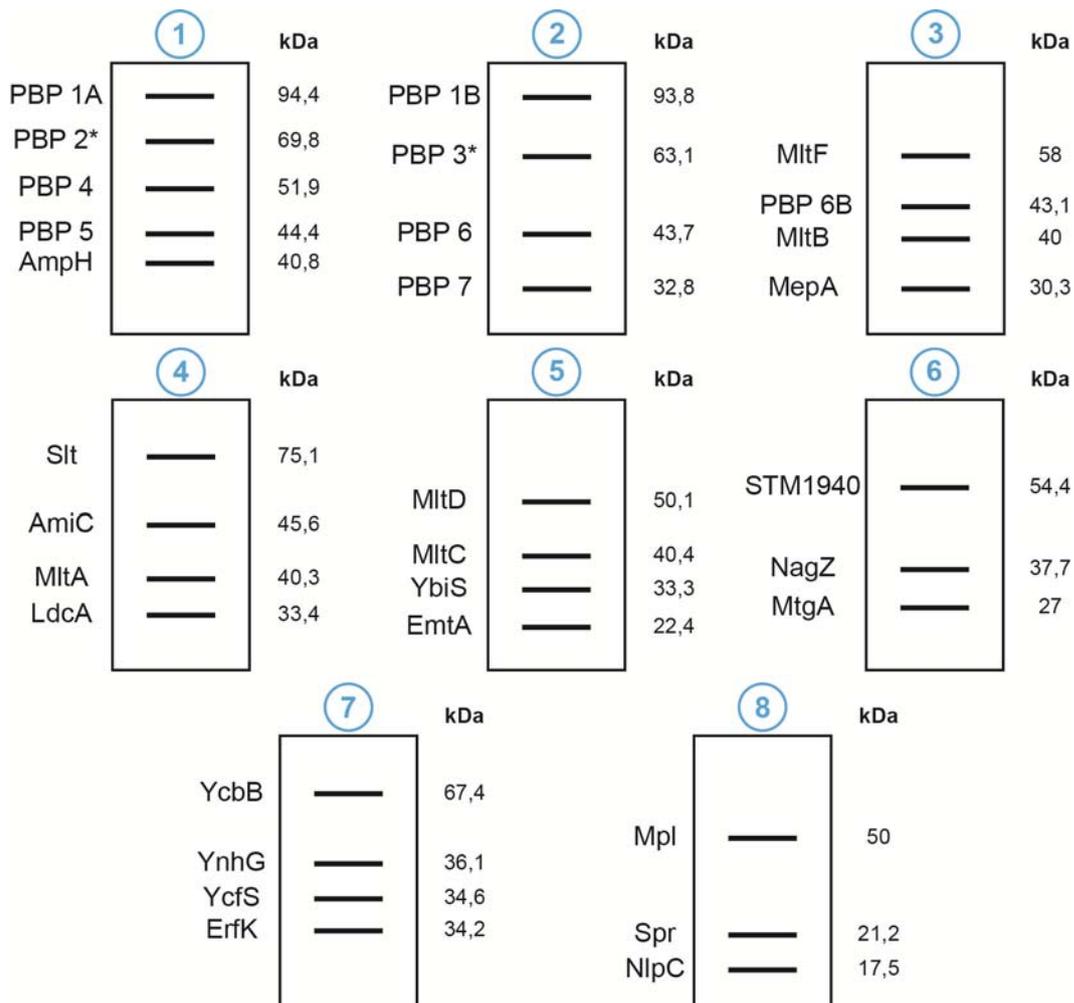


Figura 14. Movilidad electroforética de las distintas enzimas de *S. Typhimurium* que fueron etiquetadas y combinadas genéticamente en las estirpes “multi-etiqueta”. Las estirpes numeradas del 1 al 8 corresponden a las descritas en la Tabla 2. Se indica la posición relativa de cada una de las proteínas etiquetadas. Véase un ejemplo de Western en **figura 15**. Abreviatura: kDa: kilodalton.

Estas estirpes etiquetadas fueron utilizadas en ensayos de infección de líneas celulares de fibroblastos humanos BJ-5ta y de rata NRK-49F, así como de células epiteliales humanas HeLa. Como ya se ha indicado anteriormente, el criterio de construcción de las estirpes “multi-etiqueta” se basó en las diferencias en los pesos moleculares de las enzimas en estudio que permitiera su detección simultánea en ensayos de Western y no según su función. De hecho, muchas proteínas pertenecientes al mismo grupo funcional (BIO, MOD, HID y REC) tienen pesos moleculares similares.

En todas y cada una de las estirpes etiquetadas se comprobó que no existían efectos polares sobre la expresión de los genes colindantes. Además, se realizaron experimentos control para comprobar que los niveles de expresión de cada una de las proteínas no sufrían variaciones durante el proceso de construcción de una estirpe “multi-etiqueta”. De este modo, se examinaron cada una de las estirpes intermedias así como las estirpes finales. La **figura 15** muestra este control en la estirpe “multi-etiqueta” número 3, cultivada en medio mínimo PCN (“*Phosphate-Carbon-Nitrogen*”) pH 5,8 y en una fase de crecimiento exponencial, el cual confirma que la expresión de cada proteína se mantiene estable tanto en las estirpes intermedias como en la estirpe definitiva. Una vez realizadas estas comprobaciones, las estirpes “multi-etiqueta” se emplearon para los experimentos de infección de las líneas celulares descritas.

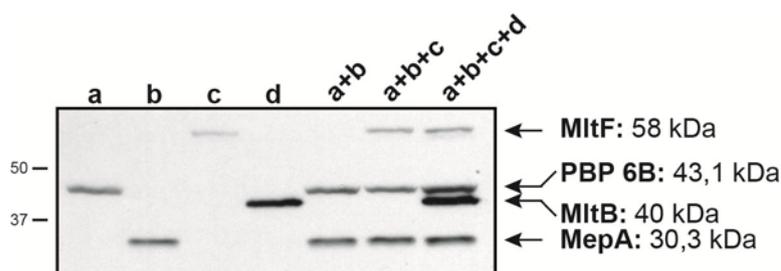


Figura 15 . Secuencia de manipulaciones genéticas en *S. Typhimurium* que derivan en la construcción de la estirpe “multi-etiqueta” 3 (*mepA::3xFLAG dacD::3xFLAG mltF::3xFLAG mltB::3xFLAG-kan*). Se muestra un ensayo de Western con anticuerpo anti-FLAG sobre extractos de proteína total obtenidos en medio PCN pH 5,8. **a: *dacD::3xFLAG-kan*; **b:** *mepA::3xFLAG*; **c:** *mltF::3xFLAG-kan*; **d:** *mltB::3xFLAG-kan*; **a+b:** *mepA::3xFLAG dacD::3xFLAG*; **a+b+c:** *mepA::3xFLAG dacD::3xFLAG mltF::3xFLAG-kan*; **a+b+c+d:** *mepA::3xFLAG dacD::3xFLAG mltF::3xFLAG mltB::3xFLAG-kan*. La estirpe “a+b+c+d” corresponde a la estirpe “multi-etiqueta” 3, esquematizada en la **figura 14**. Nótese que la expresión relativa de cada una de las cuatro proteínas se mantiene constante en las cepas que portan varias etiquetas.**

2.2 Expresión en el ambiente extracelular e intracelular de proteínas de *S. Typhimurium* con actividad sobre el peptidoglicano

Para determinar si existían cambios en la producción de algunas de las proteínas identificadas con demostrada y posible actividad sobre el peptidoglicano, se diseñaron experimentos en un conjunto variable de condiciones de crecimiento en medios de laboratorio y de infección en distintas líneas celulares eucariotas.

Como medios de laboratorio se emplearon el medio rico en nutrientes LB y los medios mínimos PCN pH 5,8, PCN pH 7,4, e ISM (“*Intracellular Salts Medium*”). El medio PCN pH 5,8 simula el ambiente presente en la vacuola que contiene *Salmonella* dentro de la célula (SCV-

“*Salmonella Containing Vacuole*”) (Deiwick *et al.*, 1999). El medio mínimo ISM reproduce el ambiente citoplasmático de la célula infectada y fue descrito por vez primera en un trabajo de células epiteliales infectadas con *Shigella flexneri* (Headley & Payne, 1990). En cada uno de los medios se analizaron los niveles de proteína tanto en fase de crecimiento estacionaria ($DO_{600} \sim 2,0-2,5$) como exponencial ($DO_{600} \sim 0,2$), todos ellos crecidos a 37°C con agitación.

En las muestras preparadas en los ensayos de infección, se analizó la producción de enzimas por bacteria intracelular aislada de dos líneas celulares distintas de fibroblastos: BJ-5ta de origen humano y NRK-49F de rata. En ambas líneas, *S. Typhimurium* muestra una tasa muy baja de crecimiento donde la replicación bacteriana está restringida (Helaine *et al.*, 2010). Se incluyeron en paralelo muestras de proteínas de bacteria creciendo activamente en células epiteliales HeLa, de origen humano. En los ensayos realizados en fibroblastos las muestras se prepararon a las 24 h post-infección (hpi), mientras que en células epiteliales el tiempo se fijó a 15 hpi con el fin de minimizar el efecto del sobrecrecimiento de la bacteria intracelular, lo que conduce a una falta de adhesión a sustrato de la célula infectada. Los datos de producción de niveles de enzimas del peptidoglicano se compararon de forma directa con los de la bacteria utilizada para infectar, que fue crecida en medio LB a 37°C durante 18 h y sin agitación. Nos referimos a esta muestra de bacteria extracelular como “inóculo”.

A efectos de mostrar en esta Tesis los niveles de las distintas proteínas en los ensayos de Western, se decidió mostrar las bandas de cada proteína por separado, agrupándolas, a su vez, por grupo funcional (BIO, MOD, HID y REC) en lugar de mostrar la imagen obtenida directamente de la cepa “multi-etiqueta”. Respecto a los niveles de producción de cada enzima en bacteria intracelular, y considerando la dificultad de igualar a la misma cantidad las muestras de bacteria intracelular entre experimentos independientes, se tomaron como significativas aquellas diferencias que eran notorias tras la inspección directa del Western y la valoración de una cantidad aproximada de la proteína utilizada como “control de carga” (IgaA) entre muestras de inóculo y de bacteria intracelular.

2.2.1 Producción de enzimas de biosíntesis del peptidoglicano (BIO) en *S. Typhimurium* extracelular e intracelular

Dentro de las enzimas asignadas al grupo funcional de biosíntesis, “BIO” (ver **Tabla 1**), se observaron variaciones en algunas de ellas en la comparativa de bacteria extracelular e intracelular. La PBP 1A y la PBP 1B presentaron unos niveles similares en el inóculo. Sin embargo, mientras que la PBP 1A se mantiene constante en bacteria intracelular, se aprecia un pequeño descenso, de aproximadamente dos veces, en la PBP 1B tras la infección (**Fig. 16**). Estas dos PBPs mantuvieron también niveles bastante constantes en los distintos medios de laboratorio, independientemente del estado de crecimiento (**Fig. 16**). La PBP 2 y la PBP 3, al ser esenciales, se identificaron con anticuerpos específicos que se obtuvieron en el presente trabajo con esta finalidad. Tanto la PBP 2 como la PBP 3 tienen unos niveles bajos de expresión en bacteria intracelular en fibroblastos aunque en células epiteliales HeLa parece aumentar su expresión respecto al inóculo y a los fibroblastos. En bacteria extracelular, la PBP 2 tiene una expresión constante en todos los medios mientras que la PBP 3 se expresa más en fase de crecimiento exponencial, perfil esperado para una PBP que participa en división celular.

De forma destacable, observamos que las PBPs específicas del género *Salmonella*, la PBP 2* y la PBP 3*, mostraban un perfil de expresión muy distinto a la PBP 2 y la PBP 3. En primer lugar, tanto la PBP 2* como la PBP 3* se expresan más en bacteria intracelular que en el inóculo (**Fig. 16**). Cabe destacar que, dentro de las muestras de bacteria intracelular, la PBP 2* se expresa más en bacteria que está en fibroblastos con respecto a la que está en células epiteliales HeLa, mientras que la PBP 3* se produce de forma similar en bacteria recuperada de todos los tipos celulares ensayados. En segundo lugar, observamos que la producción de PBP 2* y de PBP 3* es escasa en medios de laboratorio. Sólo se pudo detectar la PBP 2* en bacteria en fase exponencial crecida en LB y en PCN pH 5,8. La PBP 3* sólo se detectó en PCN pH 5,8, teniendo los mayores niveles en fase exponencial (**Fig. 16**).

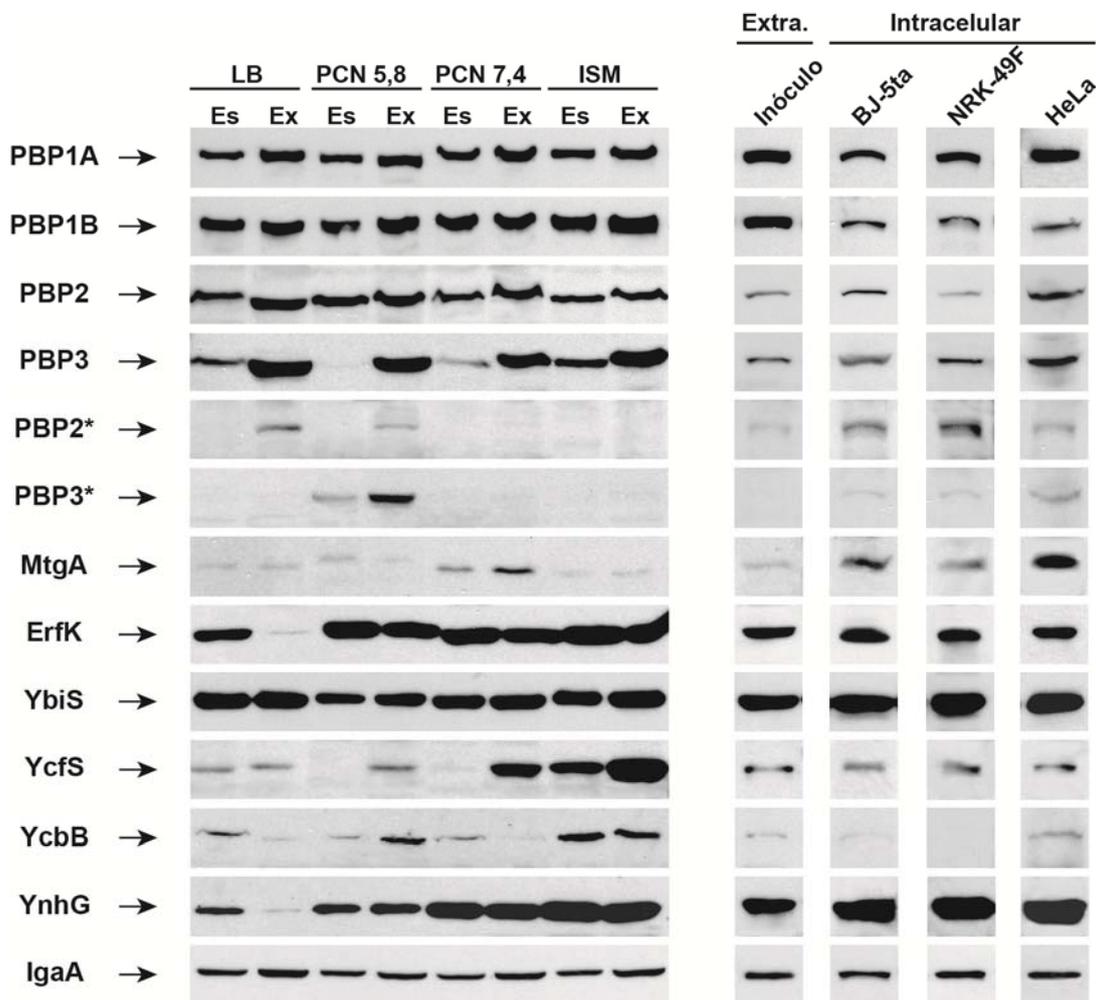


Figura 16. Expresión en el ambiente extracelular e intracelular de las proteínas de *S. Typhimurium* implicadas en la biosíntesis del peptidoglicano (BIO). Se indican las condiciones de crecimiento en fase exponencial (Ex) y estacionaria (Es) en los medios de laboratorio LB, PCN pH 5,8, PCN pH 7,4 e ISM. Se incluyen además las muestras obtenidas de la bacteria que se utilizó para infectar los cultivos de células eucariotas ("inóculo") así como las muestras de bacteria intracelular aislada de fibroblastos humanos (BJ-5ta) y de rata (NRK-49F) a 24 hpi, además de la obtenida de células epiteliales humanas HeLa a 15 hpi. Todas las proteínas se detectaron empleando un anticuerpo monoclonal anti-FLAG. Todas las muestras fueron ajustadas a una cantidad similar según la proteína empleada como control de carga, IgaA, proteína de membrana interna, que visualizamos previamente con un anticuerpo específico frente a ella (Cano *et al.*, 2002). Abreviatura: Extra., extracelular.

En el caso de MtgA, la única enzima conocida con actividad exclusiva TG, se detectaron niveles de expresión en bacteria intracelular significativamente mayores a los del inóculo. Por el contrario, *S. Typhimurium* produce escasa cantidad de MtgA en medios de laboratorio, excepto en el medio PCN pH 7,4 (**Fig. 16**).

Respecto a los datos obtenidos con el grupo de LD-transpeptidasas (LD-TPs), diferenciamos los resultados según el enlace que establezca cada enzima. Si establece enlaces entre la cadena peptídica y la lipoproteína de Braun (Lpp), tal es el caso de ErfK, YbiS e YcfS; o, entre dos grupos *m*-Dap de cadenas adyacentes, las cuales comprenden YcbB e YnhG (ver **Fig. 5**). En el caso de ErfK e YbiS, observamos altos niveles de expresión en bacteria intracelular, principalmente de YbiS, cuya expresión es elevada incluso en el inóculo y en la bacteria obtenida de los distintos medios de cultivo. Los altos niveles de estas dos LD-TPs son esperables considerando la abundancia de Lpp, su sustrato, estimada en 3×10^5 moléculas por célula. Curiosamente, en el caso de ErfK observamos que su producción desciende drásticamente en LB en fase exponencial, condición en la que YbiS podría monopolizar el anclaje de Lpp al peptidoglicano (**Fig. 16**). La tercera LD-TP específica de Lpp, YcfS, fue detectada con niveles bajos de expresión en lo que a bacteria intracelular se refiere. Sin embargo, *S. Typhimurium* aumenta de forma considerable la producción de YcfS tanto en el medio PCN pH 7,4 como en ISM (**Fig. 16**). En relación a las dos LD-TPs que establecen enlaces LD entre dos grupos *m*-Dap, YcbB e YnhG, se observó un perfil de expresión opuesto entre ambas. Mientras que se detectaron niveles bajos de YcbB en bacteria intracelular, YnhG presenta unos niveles muy elevados en estas muestras, tanto en las obtenidas de fibroblastos como de células epiteliales HeLa (**Fig. 16**). En bacteria crecida en medios de laboratorio, YcbB muestra sus mayores niveles de expresión en el medio ISM tanto en fase de crecimiento estacionaria como exponencial e YnhG se expresa principalmente en PCN pH 7,4 y en ISM. Los altos niveles en bacteria intracelular de algunas de estas LD-TPs (ErfK, YbiS e YnhG) pone de manifiesto que, en el ambiente intracelular, *S. Typhimurium* podría favorecer el establecimiento de enlaces peptídicos LD en vez de enlaces peptídicos DD.

2.2.2 Producción de enzimas de modificación del peptidoglicano (MOD) en *S. Typhimurium* extracelular e intracelular

Los resultados obtenidos para las enzimas implicadas en la modificación del peptidoglicano (MOD) se dividieron según la actividad específica de las enzimas. Las PBP 4, 7 y AmpH tienen actividad DD-endopeptidasa (DD-EPasa) (**Fig. 6, Tabla 1**). Los niveles de expresión de estas tres proteínas en la bacteria del inóculo son similares mientras que en bacteria intracelular muestran diferencias. Por un lado, observamos que la PBP 7 y AmpH aumentan su expresión en bacteria obtenida de fibroblastos y de células epiteliales, mientras que la PBP 4 muestra niveles relativamente más bajos durante la infección intracelular. En bacteria crecida en medios de laboratorio, la PBP 7 y AmpH mostraban niveles de producción apreciables en casi todas las condiciones mientras que la PBP 4 se detectaba en todos los medios probados (**Fig. 17**). Dentro del grupo de enzimas con actividad DD-carboxipeptidasa (DD-CPasa), el cual comprende PBP 4, PBP 5, PBP 6, PBP 6B y AmpH, igualmente se observaron diferencias. La PBP 4 y AmpH acaban de ser comentadas en este mismo apartado en el grupo de DD-EPasas. Con respecto a la PBP 5 y la PBP 6 observamos unos niveles de producción elevados en bacteria intracelular tanto en fibroblastos como en células epiteliales (**Fig. 17**). Estas dos PBPs ya eran producidas a esos

niveles apreciables por la bacteria del inóculo y también son abundantes en bacteria crecida en los medios de laboratorio (Fig. 17).

Hay que destacar dentro del grupo de DD-CPasas el comportamiento de la PBP 6B. Esta PBP no se detecta en bacteria del inóculo mientras que se produce a niveles elevados en bacteria intracelular obtenida de fibroblastos y de células epiteliales (Fig. 17). En medios de laboratorio, *S. Typhimurium* regula también la expresión de la PBP 6B, siendo detectada principalmente en bacteria crecida en LB hasta fase exponencial y en medio PCN pH 5,8 tanto en fase exponencial como estacionaria (Fig. 17).

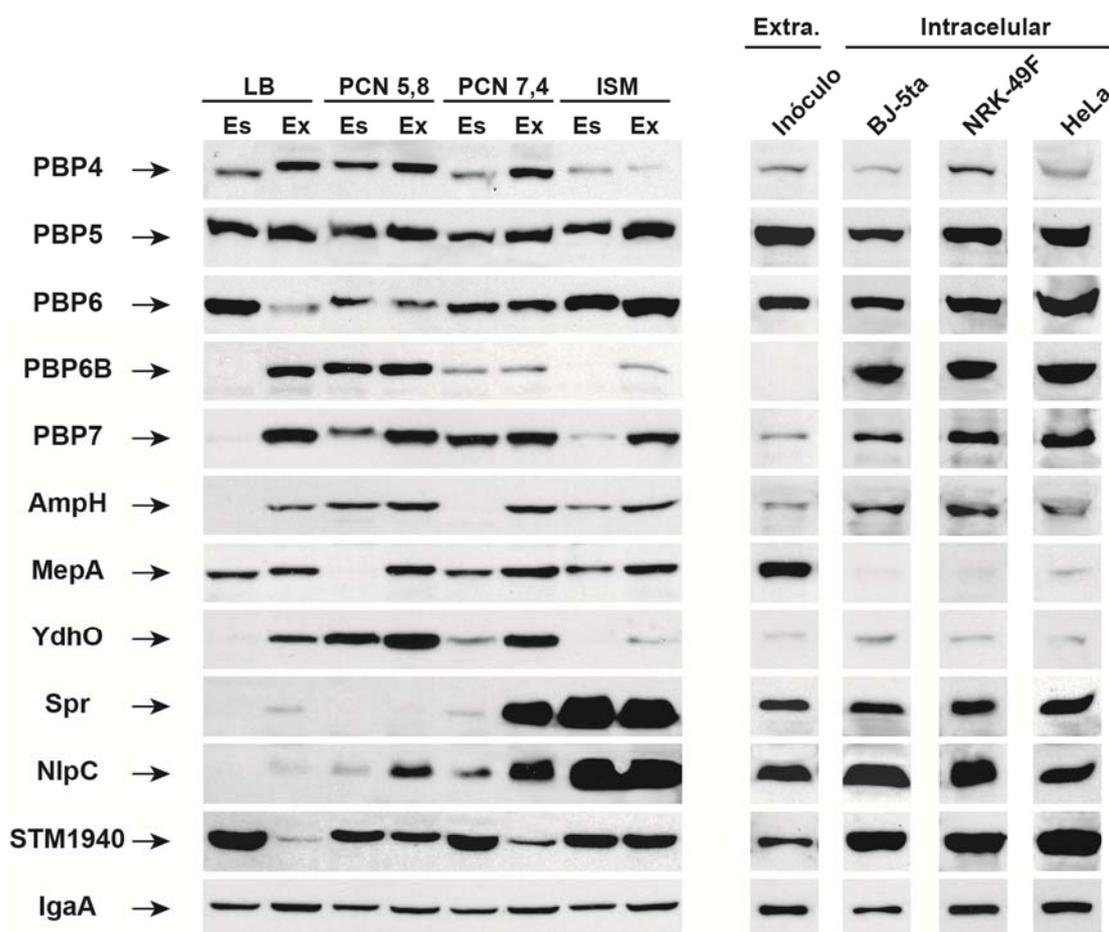


Figura 17. Expresión en el ambiente extracelular e intracelular de las proteínas de *S. Typhimurium* implicadas en la modificación del peptidoglicano (MOD). Se indican las condiciones de crecimiento en fase exponencial (Ex) y estacionaria (Es) en los medios de laboratorio LB, PCN pH 5,8, PCN pH 7,4 e ISM. Se incluyen además las muestras obtenidas de la bacteria que se utilizó para infectar los cultivos de células eucariotas ("inóculo") así como las muestras de bacteria intracelular aislada de fibroblastos humanos (BJ-5ta) y de rata (NRK-49F) a 24 hpi, además de la obtenida de células epiteliales humanas HeLa a 15 hpi. Todas las proteínas se detectaron empleando un anticuerpo monoclonal anti-FLAG. Todas las muestras fueron ajustadas a una cantidad similar según la proteína empleada como control de carga, IgaA, proteína de membrana interna, que visualizamos previamente con un anticuerpo específico frente a ella (Cano *et al.*, 2002). Abreviatura: Extra., extracelular.

La enzima MepA se ha descrito que tiene actividad tanto DD como LD-EPasa (**Fig. 6**) (Vollmer & Bertsche, 2008), aunque no es una PBP puesto que es insensible a penicilina. El perfil de expresión de MepA es opuesto al observado para la PBP 6B respecto a los niveles de la proteína en bacteria del inóculo y en bacteria intracelular (**Fig. 17**). Así, *S. Typhimurium* reduce notablemente la expresión de MepA en el interior de fibroblastos y de células epiteliales (**Fig. 17**). En bacteria crecida en medios de laboratorio, la expresión de MepA se mantiene constante en todas las condiciones excepto en PCN pH 5,8 en fase estacionaria, donde no se expresa. Esta observación obtenida en PCN pH 5,8 estaría de acuerdo con la fuerte represión de esta enzima observada en bacteria intracelular.

Las enzimas YdhO, Spr, NlpC y STM1940 comparten el dominio NlpC_P60 y la mayoría de ellas comparten también la actividad DD-EPasa (ver **Figs. 6 y 12**). Mientras YdhO apenas se expresa en bacteria intracelular, Spr, NlpC y STM1940 presentaron altos niveles de expresión en estas condiciones (**Fig. 17**). Hay que destacar que la expresión de STM1940 en bacteria intracelular es significativamente mayor respecto a la observada en la bacteria del inóculo mientras que la de Spr y NlpC está elevada tanto en la bacteria del inóculo como en la bacteria intracelular (**Fig. 17**). Spr, NlpC y STM1940 mostraron distintos perfiles de expresión en medios de laboratorio. Las condiciones más favorables de expresión para cada una de ellas fueron: YdhO en PCN pH 5,8 exponencial, Spr y NlpC en ISM en fases estacionaria y exponencial y en PCN pH 7,4 exponencial, y STM1940 en LB en fase estacionaria (**Fig. 17**).

Los altos niveles en bacteria intracelular de la mayoría de las enzimas que fueron clasificadas en el grupo de modificación (MOD) indican que *S. Typhimurium* remodela de forma activa la estructura del peptidoglicano cuando está en el interior de la célula eucariota.

2.2.3 Producción de enzimas de hidrólisis del peptidoglicano (HID) en *S. Typhimurium* extracelular e intracelular

Como se comentaba anteriormente, unos pocos genes de *S. Typhimurium* que codifican enzimas implicadas en la hidrólisis del peptidoglicano (HID) no pudieron ser etiquetados por tener una disposición génica en la que dicha modificación alteraría los genes colindantes. Este fue el caso de algunos genes que codifican amidasas (Ami) (**Fig. 6, Tabla 1**), de los que sólo se pudo etiquetar AmiC. Para el caso de las transglicosilasas líticas (TLs) (**Fig. 6**), todas se pudieron etiquetar con éxito.

En referencia a AmiC, observamos que se produce a muy bajos niveles en bacteria intracelular, similares a los detectados en la bacteria empleada como inóculo. En bacteria crecida en medios de laboratorio la producción de AmiC aumenta significativamente con respecto a bacteria intracelular (**Fig. 18**).

Los perfiles de expresión detectados para las distintas TLs nos permitieron distinguir tres grupos de enzimas. En el primero, compuesto por las enzimas MltA, MltB y EmtA (MltE), todas ellas presentan altos niveles de expresión en bacteria del inóculo, en bacteria intracelular obtenida de fibroblastos y de células epiteliales y en bacteria extracelular crecida en los distintos medios de laboratorio (**Fig. 18**). El segundo grupo lo componen MltC, MltD y MltF, cuyos niveles de expresión son bajos en bacteria intracelular aunque similares a los de la bacteria del inóculo, excepto el caso de MltC, para la que se observa un descenso en la bacteria intracelular (**Fig. 18**). El comportamiento de MltC, MltD y MltF en bacteria crecida en medios de laboratorio es muy

variable. Así, MltC mantiene una expresión similar en todos los medios empleados mientras que MltF se produce en menor cantidad en LB y en PCN pH 7,4 apenas se aprecia (Fig. 18). Observamos una fuerte regulación en la producción de MltD, que se expresa de forma específica en bacteria en fase exponencial y en todos los medios probados excepto en PCN pH 5,8 (Fig. 18). En el tercer grupo diferenciamos Slt, la única TL soluble, cuya expresión en bacteria intracelular es inapreciable (Fig. 18). Además, su expresión en bacteria crecida en medios de laboratorio es también muy baja, siendo el ISM el medio más favorable para su expresión (Fig. 18). En conclusión, *S. Typhimurium* regula la expresión de las TLs en el interior y el exterior de la célula eucariota, siendo MltA, MltB y EmtA las enzimas más abundantes en bacteria intracelular obtenida tras la infección de fibroblastos y células epiteliales.

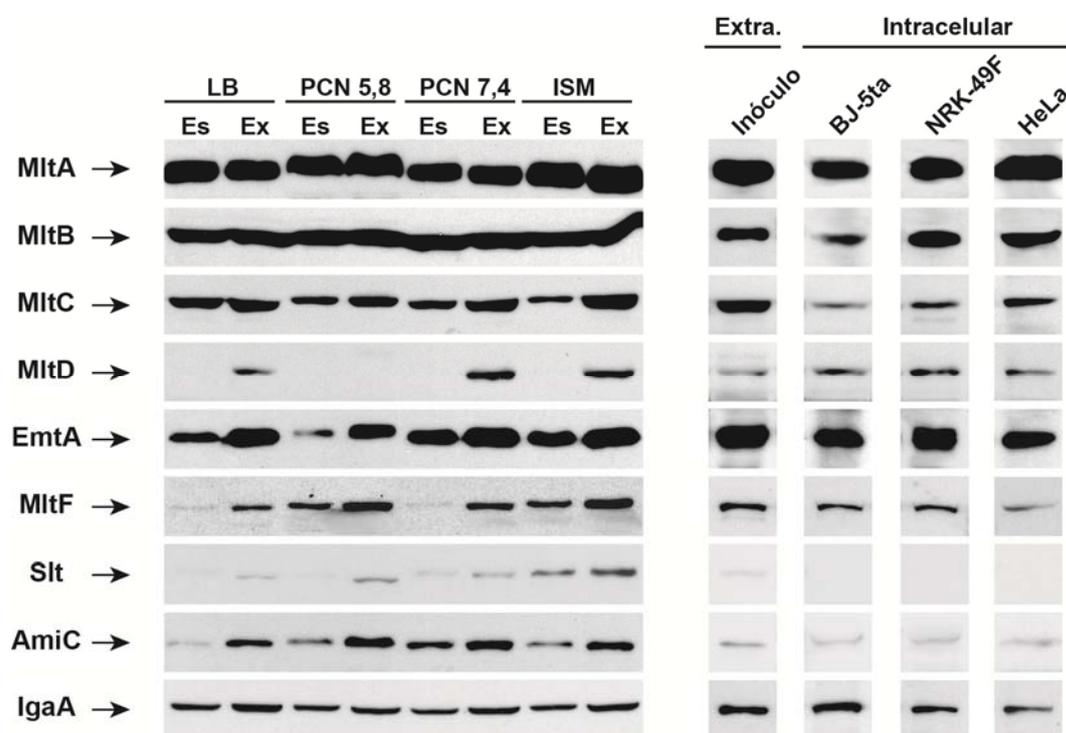


Figura 18. Expresión en el ambiente extracelular e intracelular de las proteínas de *S. Typhimurium* implicadas en la hidrólisis del peptidoglicano (HID). Se indican las condiciones de crecimiento en fase exponencial (Ex) y estacionaria (Es) en los medios de laboratorio LB, PCN pH 5,8, PCN pH 7,4 e ISM. Se incluyen además las muestras obtenidas de la bacteria que se utilizó para infectar los cultivos de células eucariotas (“inóculo”) así como las muestras de bacteria intracelular aislada de fibroblastos humanos (BJ-5ta) y de rata (NRK-49F) a 24 hpi, además de la obtenida de células epiteliales humanas HeLa a 15 hpi. Todas las proteínas se detectaron empleando un anticuerpo monoclonal anti-FLAG. Todas las muestras fueron ajustadas a una cantidad similar según la proteína empleada como control de carga, IgaA, proteína de membrana interna, que visualizamos previamente con un anticuerpo específico frente a ella (Cano *et al.*, 2002). Abreviatura: Extra., extracelular.

2.2.4 Producción de enzimas de reciclaje del peptidoglicano (REC) en *S. Typhimurium* extracelular e intracelular

En este trabajo etiquetamos tres enzimas de *S. Typhimurium* que participan en el reciclaje del peptidoglicano (REC), NagZ, LdcA y Mpl. Estas tres enzimas son producidas a niveles altos tanto por la bacteria del inóculo como por la bacteria intracelular que obtuvimos de fibroblastos y células epiteliales (**Fig. 19**). NagZ, LdcA y Mpl son también abundantes en bacteria crecida en los distintos medios de laboratorio (**Fig. 19**), aunque observamos niveles relativamente mayores de NagZ con respecto a LdcA y de ésta en comparación con Mpl. Estos datos apoyan la idea de que *S. Typhimurium* podría utilizar de forma muy activa el proceso de reciclaje del peptidoglicano en el interior de la célula eucariota, probablemente con el fin de mantener su viabilidad en la misma.

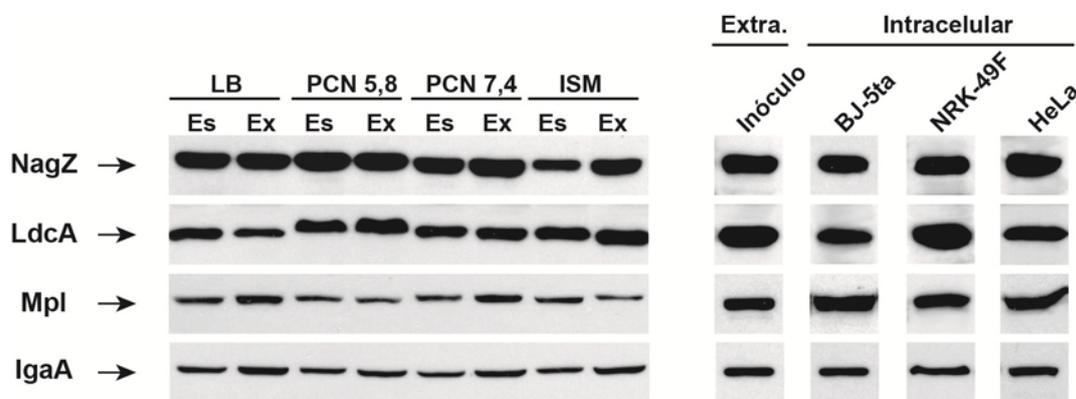


Figura 19. Expresión en el ambiente extracelular e intracelular de las proteínas de *S. Typhimurium* implicadas en el reciclaje del peptidoglicano (REC). Se indican las condiciones de crecimiento en fase exponencial (Ex) y estacionaria (Es) en los medios de laboratorio LB, PCN pH 5,8, PCN pH 7,4 e ISM. Se incluyen además las muestras obtenidas de la bacteria que se utilizó para infectar los cultivos de células eucariotas ("inóculo") así como las muestras de bacteria intracelular aislada de fibroblastos humanos (BJ-5ta) y de rata (NRK-49F) a 24 hpi, además de la obtenida de células epiteliales humanas HeLa a 15 hpi. Todas las proteínas se detectaron empleando un anticuerpo monoclonal anti-FLAG. Todas las muestras fueron ajustadas a una cantidad similar según la proteína empleada como control de carga, IgaA, proteína de membrana interna, que visualizamos previamente con un anticuerpo específico frente a ella (Cano *et al.*, 2002). Abreviatura: Extra., extracelular.

En su conjunto, los datos obtenidos con las estirpes de *S. Typhimurium* en las que se etiquetaron genes que codifican enzimas del metabolismo del peptidoglicano permiten distinguir distintos grupos en relación a sus abundancias relativas y el nivel de regulación de las mismas.

Un fenómeno observado es que, en la mayoría de los casos, no existía una correlación entre un determinado medio de cultivo y el perfil de expresión en bacteria intracelular. Quizás, la única excepción sea MepA, que aparece sujeta a una fuerte represión en el interior de la célula eucariota y en bacteria que alcanza la fase estacionaria en medio PCN pH 5,8 (**Fig. 17**). En otros casos, podemos decir que se obtuvieron resultados de alguna forma contradictorios. Por ejemplo, Spr y STM1940 presentan niveles de expresión elevados en las muestras de bacteria intracelular. Sin embargo, Spr no se expresa ni en LB ni en PCN pH 5,8 mientras que tiene unos niveles muy elevados de expresión en ISM (**Fig. 17**). Por el contrario, STM1940 presenta niveles similares de expresión en el PCN pH 5,8 y en el ISM, aunque su mayor expresión es en LB en fase estacionaria (**Fig. 17**).

CAPÍTULO 3

Estudio funcional de las enzimas del metabolismo del peptidoglicano en la infección de células eucariotas por *S. enterica* serovar Typhimurium

El peptidoglicano es el componente esencial que mantiene la viabilidad celular y la morfología de las bacterias. Estas propiedades hacen pensar que la pérdida de uno o varios de los genes implicados en su metabolismo podría causar un efecto significativo sobre la viabilidad. En el ambiente intracelular de la célula eucariota, donde el patógeno está sometido a la respuesta de defensa de la célula infectada y diversas situaciones de estrés (pH ácido, limitación de nutrientes, compuestos reactivos de oxígeno y nitrógeno), el requerimiento de determinadas enzimas del metabolismo del peptidoglicano podría ser aún más crítico. Como contrapartida, podría suponerse que la acomodación al ambiente intracelular establecería un estado de “mínimos” a nivel metabólico, donde algunas, sino muchas enzimas del peptidoglicano, podrían hacerse dispensables. Los datos mostrados en el capítulo 2 nos indicaban, no obstante, que muchas de las enzimas del peptidoglicano examinadas son producidas por la bacteria que se localiza en el interior de las células eucariotas.

Con el objeto de analizar la contribución de las enzimas implicadas en el metabolismo del peptidoglicano en la infección intracelular, se realizaron ensayos para determinar la tasa de invasión y el índice de proliferación (I_{pro}) intracelulares de distintos mutantes respecto a la estirpe silvestre. Además, procedimos a estudiar la morfología de todos estos mutantes, con el fin de detectar posibles cambios respecto a la estirpe silvestre que pudieran afectar su capacidad de invasión de células eucariotas. Las condiciones de crecimiento extracelular en las que se observaron las morfologías fueron dos: a) bacteria en fase de crecimiento estacionario (LB a 37°C durante 18 h y sin agitación) y b) bacteria en fase de crecimiento exponencial (LB a 37°C a una $DO_{600} \sim 0,2$ con agitación). En la **tabla A11** del anexo se describen todos los mutantes de *S. Typhimurium*, isogénicos a la estirpe silvestre SV5015 (SL1344 His+), que se construyeron en este trabajo, con deficiencias en uno o más de los genes que codifican enzimas del metabolismo del peptidoglicano.

En los ensayos preliminares de infección se emplearon mutantes con deficiencia en un solo gen (mutantes sencillos), utilizándose como modelo de infección fibroblastos humanos BJ-5ta. En experimentos posteriores, en los que se emplearon los mutantes carentes de varios de estos genes (mutantes múltiples), se utilizaron los fibroblastos de rata NRK-49F. El motivo esencial para el empleo de esta segunda línea celular de fibroblastos de rata es que el fenómeno de persistencia intracelular de *S. Typhimurium* está más acentuado (Cano *et al.*, 2001).

3.1 Comportamiento en infección de mutantes sencillos de *S. Typhimurium* con deficiencias en enzimas del metabolismo del peptidoglicano

Se construyeron un total de cuarenta y un mutantes de *S. Typhimurium* isogénicos a la estirpe parental SV5015 y con deficiencias en un determinado gen implicado en el metabolismo del peptidoglicano (**Tabla 3**). Como control de la ausencia de efecto polar de estas construcciones genéticas, se comparó la expresión mediante RT-PCR semi-cuantitativa (“*Retrotranscriptase-Polymerase Chain Reaction*”) de cada uno de los genes adyacentes a los genes deletados tanto en la estirpe silvestre como en la mutante (**Fig. 20**). La **figura 20** muestra dos ejemplos para el caso de los mutantes $\Delta STM1836::kan$ y $\Delta nagZ::kan$. Los niveles de expresión de los genes adyacentes no se ven alterados en las estirpes mutantes con respecto a la parental, por lo que se concluye que estas construcciones genéticas no causan efecto polar. Ocasionalmente, sin embargo, observamos que se producían efectos polares. En estos casos, procedimos a la eliminación del casete que contiene el gen de resistencia antibiótica resultando en nula o mínima

alteración de la expresión de los genes adyacentes. Una vez comprobada la expresión igualitaria de los genes colindantes en todas y cada una de las estirpes con deficiencias en genes del metabolismo del peptidoglicano, se realizaron ensayos de infección en fibroblastos BJ-5ta hasta 24 hpi para comprobar su capacidad de persistencia en el ambiente intracelular. Ninguno de los cuarenta y un mutantes de *S. Typhimurium* con deficiencia en un determinado gen implicado en el metabolismo del peptidoglicano mostró diferencias estadísticamente significativas en relación a la estirpe silvestre ni respecto a las tasas de invasión y de proliferación intracelular (ejemplo en **Fig. A2** del anexo I). Hay que considerar que muchas de estas enzimas tienen actividades solapantes o redundantes (véanse **Figs. 5 y 6**), lo que hace pensar que en el modelo de infección de fibroblastos, la pérdida de alguna de estas enzimas podría ser fácilmente compensada por otra que comparta la misma actividad enzimática. Esta interpretación permite explicar el porqué la delección de una de las enzimas no propicia cambios de viabilidad o morfológicos en la bacteria a pesar de que la actividad bioquímica (la formación o ruptura de un determinado enlace) pueda ser esencial para su supervivencia.

Tabla 3. Mutantes sencillos de *S. Typhimurium*, con deficiencia en genes que codifican enzimas del metabolismo del peptidoglicano y usados en ensayos de infección (*)

Estirpe	Genotipo	MD2523	$\Delta dacB::kan$	MD3932	$\Delta mltC-nupG::kan$
MD2591	$\Delta mrcA$	MD2518	$\Delta dacA::kan$	MD2553	$\Delta mltD::kan$
MD2569	$\Delta mrcB$	MD2512	$\Delta dacC::kan$	MD2531	$\Delta emtA::kan$
MD2535	$\Delta pbpC$	MD2501	$\Delta dacD::kan$	MD3715	$\Delta mltF::kan$
MD2517	$\Delta STM1910::kan$	MD2511	$\Delta pbpG::kan$	MD2556	$\Delta slt::kan$
MD2502	$\Delta STM1836::kan$	MD2554	$\Delta ampH::kan$	MD2575	$\Delta STM4216-4218$
MD2538	$\Delta mtgA::kan$	MD2524	$\Delta mepA::kan$	MD2541	$\Delta amiA::kan$
MD3770	$\Delta erfK::kan$	MD3352	$\Delta ydhO::kan$	MD2542	$\Delta amiB::kan$
MD3771	$\Delta ybiS::kan$	MD3711	$\Delta spr::kan$	MD2530	$\Delta amiC::kan$
MD3784	$\Delta ycfS::kan$	MD3367	$\Delta nlpC::kan$	MD2550	$\Delta ampD::kan$
MD3772	$\Delta ycbB::kan$	MD3350	$\Delta STM1940::kan$	MD2552	$\Delta nagZ::kan$
MD3779	$\Delta ynhG::kan$	MD3250	$\Delta yibP-yigQ::kan$	MD2557	$\Delta ldcA::kan$
MD3780	$\Delta yafK::kan$	MD2551	$\Delta mltA::kan$	MD3753	$\Delta mpl::kan$
MD3781	$\Delta STM3277::kan$	MD2529	$\Delta mltB::kan$	MD3353	$\Delta ycjI::kan$

(*) Todas las estirpes son isogénicas a la estirpe silvestre SV5015 (SL1344 His+).

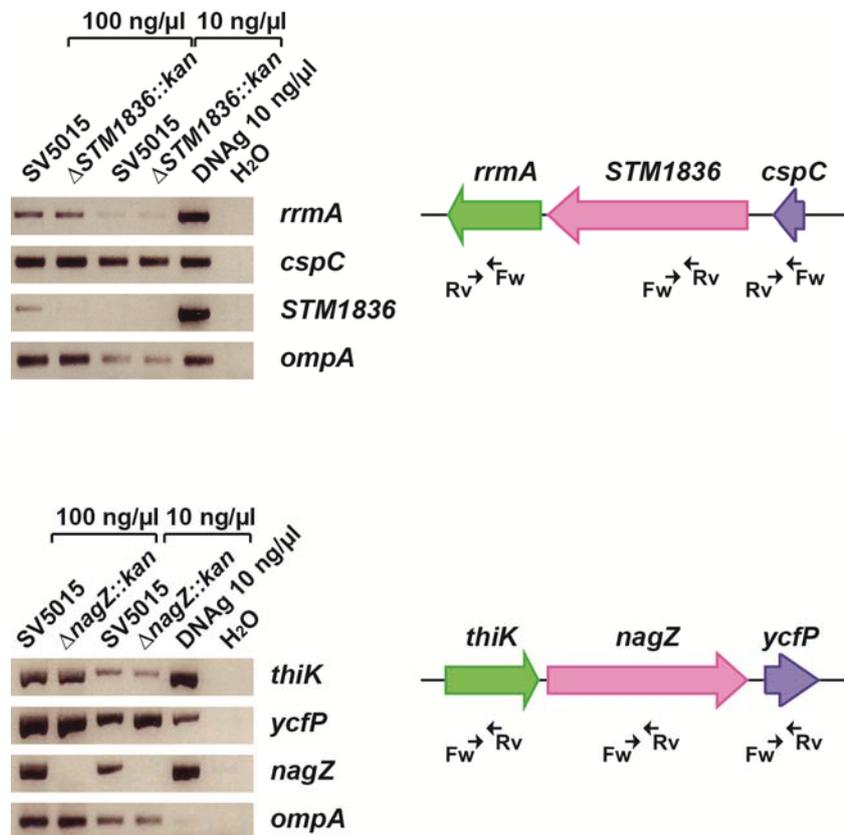


Figura 20. Prueba mediante RT-PCR de posibles efectos polares sobre la expresión de genes adyacentes al gen implicado en el metabolismo del peptidoglicano. Expresión en los mutantes $\Delta STM1836::kan$ y $\Delta nagZ::kan$ de sus genes adyacentes *rrmA* y *cspC*, y *thiK* e *ycfP*, respectivamente. En ninguno de los casos se observan diferencias entre los niveles de transcrito de RNA de las estirpes mutantes respecto a la estirpe silvestre (SV5015). En todos los ensayos se utilizaron como controles DNA genómico (DNAG), H₂O y el gen *ompA*.

3.2 Comportamiento en infección de mutantes múltiples de *S. Typhimurium* con deficiencia simultánea en varias enzimas del metabolismo del peptidoglicano

Tras obtener los resultados descritos en el apartado anterior, decidimos analizar la capacidad de “reemplazamiento funcional” que tienen las enzimas del peptidoglicano de *S. Typhimurium* de forma similar a lo que hicieron Denome y colaboradores (1999) para *E. coli*. Para responder a esta pregunta, construimos una colección isogénica de veinticinco mutantes múltiples de *S. Typhimurium* derivados de la estirpe SV5015 siguiendo dos estrategias. En la primera, se combinaron deficiencias en genes que codifican enzimas con la misma actividad (Tabla 4). En la segunda, combinamos deficiencias en genes que codifican enzimas que en nuestros ensayos de Western mostraban una producción elevada en bacteria intracelular (Figs. 16-19). Esta segunda colección de mutantes múltiples se describe en la Tabla 6.

En la mayoría de los mutantes múltiples con deficiencias en varias enzimas con la misma actividad, no pudimos deletar todos los genes de cada grupo funcional con la excepción del grupo de enzimas con actividad LD-TP (Tabla 4). Ese impedimento para eliminar todas las enzimas con una determinada actividad podría deberse al efecto sobre la viabilidad de la bacteria que podría tener la combinación de varias mutaciones. Un ejemplo muy representativo es el de la

PBP 1A y la PBP 1B que, aun siendo dispensables para el crecimiento, su ausencia simultánea es letal. Así mismo, la presencia en el cromosoma de muchos sitios de reconocimiento FLP de la recombinasa lambda-Red, que quedan como cicatrices tras la delección de un grupo de genes (Datsenko & Wanner, 2000), pueden conducir a un impedimento para seguir eliminando genes en un determinado fondo genético.

3.2.1 Ensayos en mutantes múltiples carentes de enzimas con la misma actividad sobre el metabolismo del peptidoglicano

Con los mutantes múltiples según actividad enzimática (**Tabla 4**), se realizaron ensayos de infección en fibroblastos de rata NRK-49F. Se infectaron las células durante 20 min y, transcurridas 2 h, 24 h y 48 h, se plaquearon diluciones seriadas de los extractos del cultivo infectados por un procedimiento denominado en “gotas” con el fin de facilitar el ensayo simultáneo de varios mutantes. Véase un ejemplo en la **figura 21**. En cada uno de los experimentos se utilizaron dos controles de la infección. Por un lado, la estirpe silvestre (SV5015), con la que comparar la capacidad de supervivencia intracelular del mutante múltiple; y, por el otro, el mutante $\Delta rpoE$, que pierde viabilidad de forma muy notoria en la infección de fibroblastos (**Fig. 21E**) (Cano *et al.*, 2001). En aquellos casos en los que se apreciaron diferencias entre la estirpe silvestre y el mutante múltiple empleado, procedimos a realizar ensayos de infección “estándar” donde se cuantifica el número de bacteria intracelular viable y se determina el índice de proliferación (Ipro). Además, también se analizó la morfología de cada uno de estos mutantes múltiples.

El estudio de los mutantes múltiples sobre la actividad de biosíntesis (BIO) mostró dos estirpes con un fenotipo destacable: i) aquella que implica la pérdida de las PBPs 1B, 3* y 2* ($\Delta mrcB \Delta STM1836::kan \Delta STM1910::cat$) (**Fig. 21B**); y, ii) aquella que incluye la pérdida de todas las enzimas LD-TPs ($\Delta erfK \Delta ybiS \Delta ycbB \Delta ycfS \Delta ynhG \Delta yafK \Delta STM3277::kan$) (**Fig. 21D**).

En la estirpe carente de las PBPs 1B, 3* y 2* se produce un descenso en la viabilidad a las 24 y 48 hpi (**Fig. 21B**). Ensayos de invasión y proliferación realizados en paralelo con un mutante carente de la PBP 1B ($\Delta mrcB$) o el doble mutante carente de las PBPs 3* y 2* ($\Delta STM1836::kan \Delta STM1910::cat$) mostraron que el triple mutante mostraba una tasa menor de invasión del fibroblasto, fenotipo no observado en el resto de estirpes (**Fig. 22A**). Con respecto a la tasa de proliferación/supervivencia intracelular, se observaron diferencias significativas en viabilidad, del orden de 3 veces entre el triple mutante y el resto de estirpes a las 24 y 48 hpi (**Fig. 22B**). Por otro lado, el examen morfológico de este conjunto de estirpes no mostró alteraciones apreciables entre las mismas (**Fig. 22C**).

Tabla 4. Colección de mutantes múltiples de *S. Typhimurium* con deficiencia simultánea en genes que codifican enzimas del peptidoglicano con la misma actividad metabólica (*)

Grupo ^(**)	Actividad enzimática ^(***)	Gen	Estirpes múltiples empleadas en la infección
BIO	TG/TP	<i>mrcA</i> <i>mrcB</i> <i>STM1910</i> <i>STM1836</i> <i>mtgA</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ $\Delta STM1910 \Delta STM1836 \Delta mrcA$ ○ $\Delta mrcB \Delta STM1836::kan \Delta STM1910::cat$ ○ $\Delta STM1910 \Delta STM1836 \Delta mtgA::kan$
	LD-TP	<i>erfK</i> <i>ybiS</i> <i>ycbB</i> <i>ycfS</i> <i>ynhG</i> <i>yafK</i> <i>STM3277</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ $\Delta erfK \Delta ybiS \Delta ycfS \Delta ynhG \Delta ycbB \Delta yafK \Delta STM3277::kan$
MOD	CPasa	<i>dacB</i> <i>dacA</i> <i>dacC</i> <i>dacD</i> <i>ampH</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ $\Delta dacC \Delta dacD \Delta pbpG \Delta dacA \Delta dacB \Delta ampH::kan$
	EPasa	<i>dacB</i> <i>pbpG</i> <i>ampH</i> <i>mepA</i> <i>ydhO</i> <i>spr</i> <i>nlpC</i> <i>STM1940</i> <i>yibP</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ $\Delta STM1940 \Delta ydhO \Delta spr \Delta nlpC \Delta mepA \Delta yibP-yigQ \Delta ampH::kan$ ○ $\Delta STM1940 \Delta ydhO \Delta spr \Delta nlpC \Delta mepA \Delta yibP-yigQ \Delta dacB::kan$ ○ $\Delta STM1940 \Delta ydhO \Delta spr \Delta nlpC \Delta mepA \Delta yibP-yigQ \Delta pbpG::kan$
HID	TL	<i>mltA</i> <i>mltB</i> <i>mltC</i> <i>mltD</i> <i>emtA/mltE</i> <i>mltF</i> <i>slt</i> <i>STM4217</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ $\Delta slt \Delta mltD \Delta emtA \Delta STM4216-4218::kan$ ○ $\Delta slt \Delta mltD \Delta emtA \Delta mltC-nupG::kan$ ○ $\Delta slt \Delta mltD \Delta emtA \Delta mltF::kan$ ○ $\Delta slt \Delta mltD \Delta emtA \Delta mltA::kan$ ○ $\Delta slt \Delta mltD \Delta emtA \Delta mltB::kan$ ○ $\Delta slt \Delta mltD \Delta mltC-nupG::kan$
	Ami	<i>amiA</i> <i>amiB</i> <i>amiC</i> <i>ampD</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ $\Delta amiA \Delta amiB \Delta amiC \Delta ampD::kan$
REC	β -hexosaminidasa LD-CPasa Ami	<i>nagZ</i> <i>ldcA</i> <i>ampD</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ $\Delta ampD \Delta ldcA \Delta nagZ::kan$

(*) Todas las estirpes son isogénicas a la estirpe silvestre SV5015 (SL1344 His+). (**) **BIO**: biosíntesis; **MOD**: modificación; **HID**: hidrólisis; **REC**: reciclaje. (***) Actividades referidas a las mostradas en las Fig. 5, 6 y 7. **PBP**: "Penicillin Binding Protein".

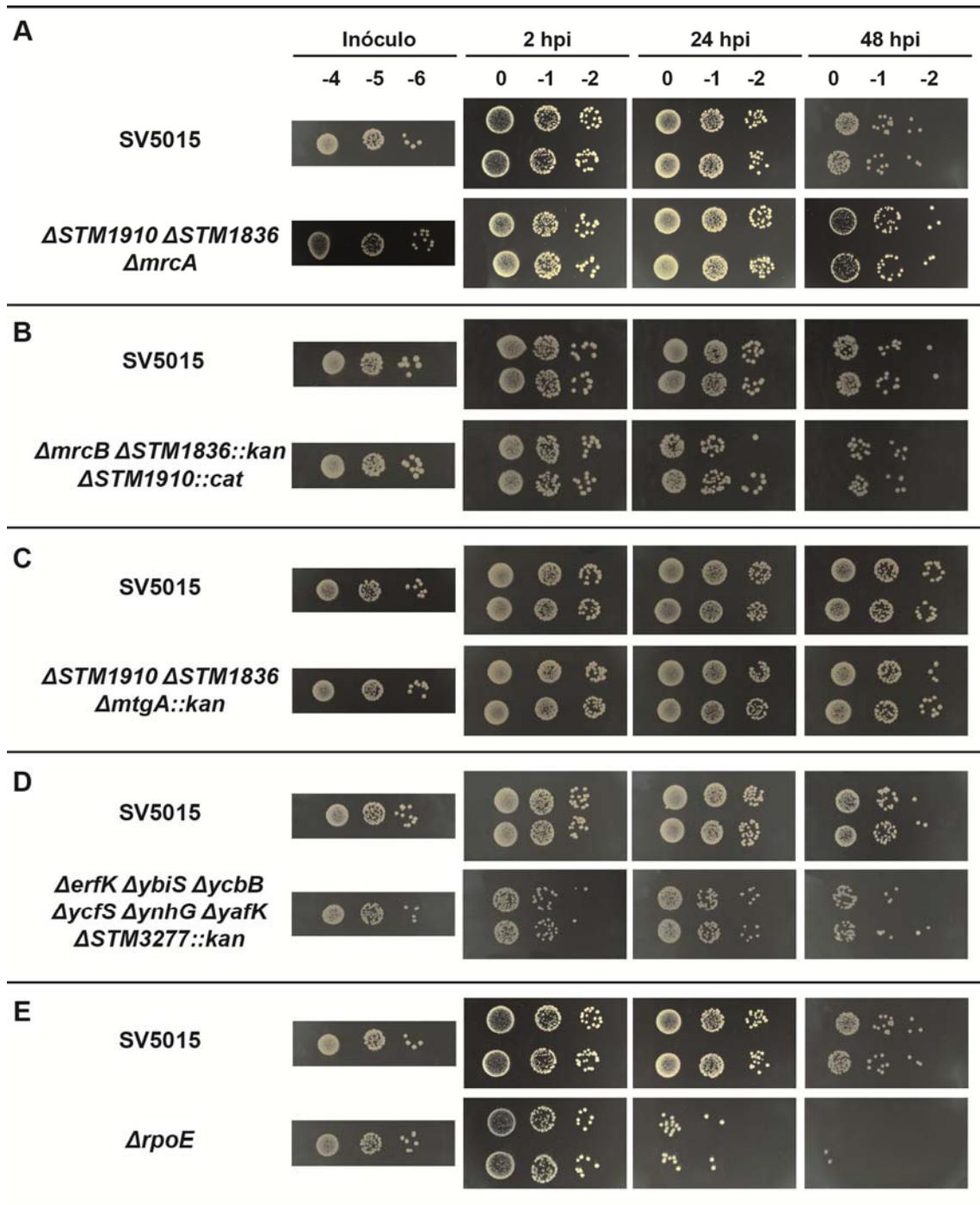


Figura 21. Estimación mediante el ensayo de “gota” de las tasas de invasión y crecimiento intracelular en fibroblastos de rata NRK-49F de mutantes múltiples de *S. Typhimurium* deficientes en enzimas de biosíntesis (BIO) del peptidoglicano. Estas estirpes están descritas en la Tabla 4. Cada uno de los mutantes está representado respecto a la estirpe silvestre SV5015 (SL1344 His+) (A, B, C, D). En el panel E se muestra el mutante $\Delta rpoE$, el cual experimenta una rápida caída de viabilidad dentro de fibroblastos (Cano *et al.*, 2001). Las imágenes corresponden a un experimento representativo de un total de tres repeticiones biológicas independientes.

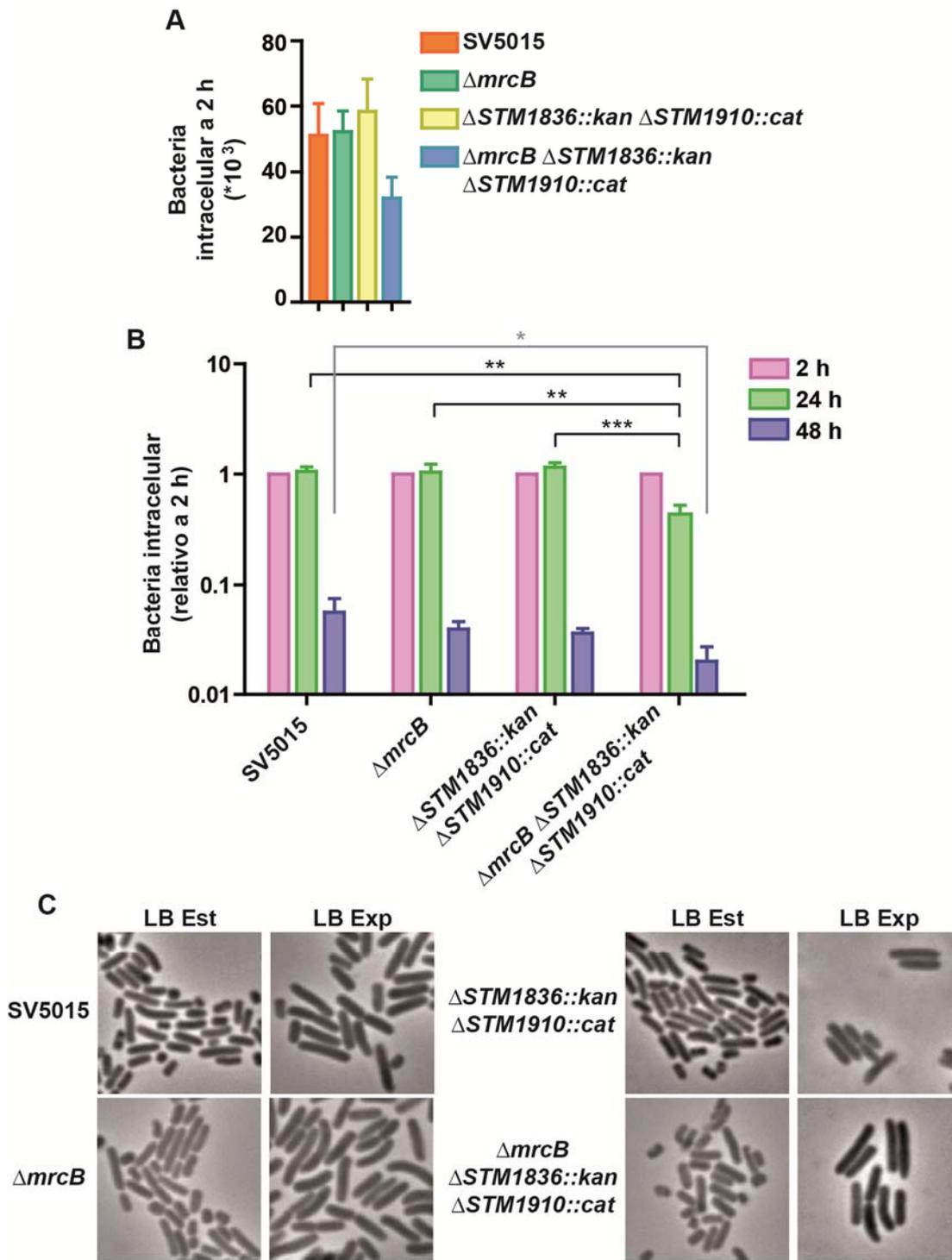


Figura 22. El triple mutante $\Delta mrcB \Delta STM1836::kan \Delta STM1910::cat$ de *S. Typhimurium* presenta una tasa de proliferación intracelular reducida en fibroblastos NRK-49F. Las estirpes empleadas incluyeron el mutante sencillo $\Delta mrcB$ (PBP 1B); el doble mutante $\Delta STM1836$ (PBP 3*) y $\Delta STM1910$ (PBP 2*); y, el triple mutante $\Delta mrcB$ (PBP 1B), $\Delta STM1836$ (PBP 3*) y $\Delta STM1910$ (PBP 2*). **A:** número de bacterias intracelulares viables a las 2 hpi indicativo de la tasa de invasión. **B:** tasa de proliferación intracelular (Ipro) de estos mutantes resultante de calcular el cociente entre el número de bacterias intracelulares viables a 24 o 48 hpi frente a las 2 hpi. Se realizó el análisis estadístico de los datos mediante ANOVA de una vía y post-test de Tukey, comparando las medias de los mutantes entre ellas y con la de la estirpe silvestre. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Los valores corresponden a la media y la desviación estándar relativos a la estirpe silvestre de un mínimo de tres experimentos independientes. **C:** análisis de la morfología de estos mutantes. LB Est: bacteria en fase estacionaria, medio LB, 18 h a 37°C sin agitación; LB Exp: bacteria en medio LB, en fase exponencial ($DO_{600} \sim 0,2$), a 37°C y con agitación. Barra de aumento: 5 μm .

Adicionalmente, en los estudios de la morfología de otros mutantes incluidos en este grupo ($\Delta STM1910 \Delta STM1836 \Delta mrcA$ y $\Delta STM1910 \Delta STM1836 \Delta mtgA::kan$), no se observaron cambios (Fig. 23).

En el caso del mutante múltiple carente de todas las LD-TPs conocidas: $\Delta erfK \Delta ybiS \Delta ycbB \Delta ycfS \Delta ynhG \Delta yafK \Delta STM3277::kan$, el ensayo de viabilidad “en gota” ya mostraba un claro descenso de viables a las 2 hpi, que se acentuaba a las 24 y a las 48 hpi (Fig. 21D). El bajo número de viables de este mutante a 2 hpi se relacionó con una tasa baja de invasión al realizar los ensayos estándar con cuantificación de bacteria intracelular (Fig. 24A). Curiosamente, a 24 hpi, la tasa de proliferación intracelular del mutante en las LD-TPs presentaba un aumento, significativamente diferente ($p < 0,05$), respecto a la estirpe silvestre (Fig. 24B). Este fenotipo apoyaba la idea de que, una vez dentro de la célula eucariota, el mutante podría multiplicarse a una tasa ligeramente superior a la de la estirpe silvestre (Fig. 24B). Por otro lado, el examen de la morfología de este mutante carente de las LD-TPs no mostró diferencias respecto a la estirpe silvestre (Fig. 24C).

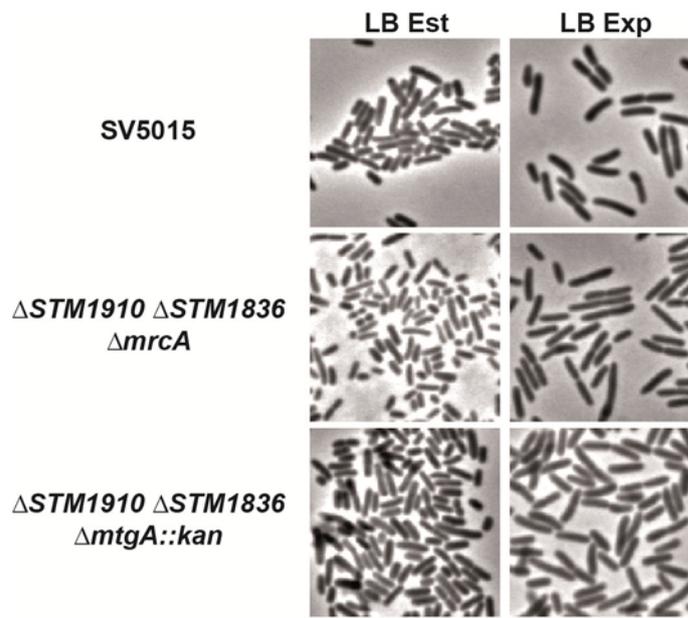


Figura 23. Morfología de los mutantes múltiples de *S. Typhimurium* con deficiencias en enzimas implicadas en la biosíntesis (BIO) del peptidoglicano. Las estirpes empleadas están descritas en la **Tabla 4**. No se observan diferencias apreciables con respecto a la estirpe parental SV5015 (SL1344 His+). LB Est: bacteria en fase estacionaria, medio LB, 18 h a 37°C sin agitación; LB Exp: bacteria en medio LB, en fase exponencial ($DO_{600} \sim 0,2$), a 37°C y con agitación. Barra de aumento: 5 μm .

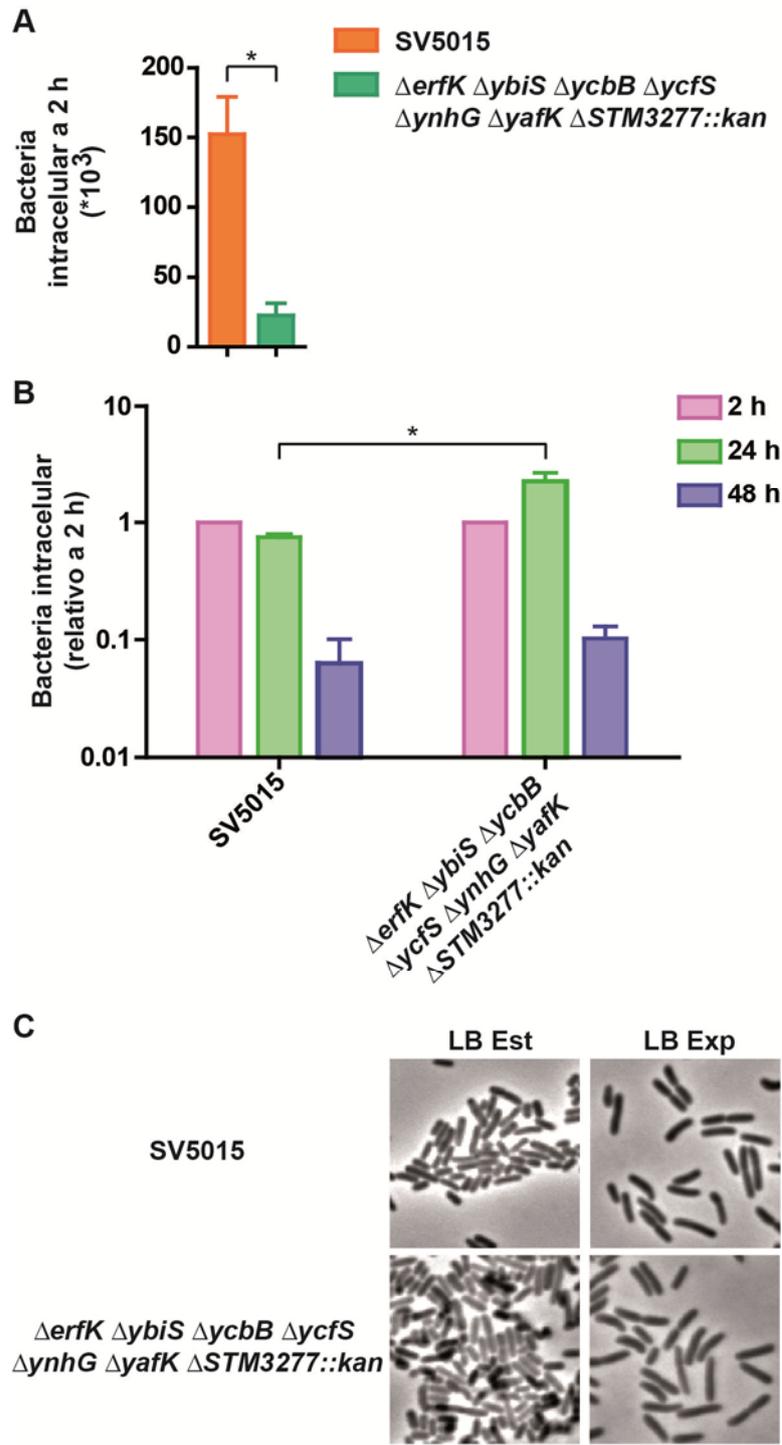


Figura 24. El mutante múltiple $\Delta erfK \Delta ybiS \Delta ycbB \Delta ycfS \Delta ynhG \Delta yafK \Delta STM3277::kan$ presenta una menor tasa de invasión mientras que la tasa de proliferación intracelular en fibroblastos NRK-49F está aumentada. Se muestra el mutante deficiente en todas las enzimas conocidas con actividad LD-TP: ErfK, YbiS, YcbB, YcfS, YnhG, YafK y STM3277. **A:** bacteria intracelular viable a las 2 hpi indicativo de la tasa de invasión. Tras el análisis estadístico mediante el test t de Student, se apreció que el descenso en la tasa de invasión del mutante era estadísticamente significativo, $*p < 0,05$. **B:** tasa de proliferación intracelular (Ipro) de este mutante resultante de calcular el cociente entre el número de bacterias intracelulares viables a 24 o 48 hpi frente a las 2 hpi. Se realizó el análisis estadístico de los datos mediante t de Student comparando la media del mutante con la de la estirpe silvestre. $*p < 0,05$. Los valores corresponden a la media y la desviación estándar relativos a la estirpe silvestre de un mínimo de tres experimentos independientes. **C:** análisis de la morfología de este mutante en el que no se apreciaron diferencias respecto a la estirpe silvestre. LB Est: bacteria en fase estacionaria, medio LB, 18 h a 37°C sin agitación; LB Exp: bacteria en medio LB, en fase exponencial ($DO_{600} \sim 0,2$), a 37°C y con agitación. Barra de aumento: 5 μm .

Los ensayos de “gota” realizados con los mutantes deficientes en enzimas con actividad de modificación (MOD) también mostraron algunos fenotipos en determinados mutantes. Así, el mutante $\Delta dacC \Delta dacD \Delta pbpG \Delta dacA \Delta dacB \Delta ampH::kan$ mostró un comportamiento similar al de la estirpe silvestre (**Fig. 25A**). En cambio, la deficiencia de otras seis enzimas del grupo MOD ($\Delta STM1940 \Delta ydhO \Delta spr \Delta nlpC \Delta mepA \Delta yibP$) además de una séptima enzima, bien AmpH, DacB o PBP 7 (*pbpG*) conducía a cambios en el comportamiento de la bacteria intracelular. Con respecto a la estirpe parental, en estos mutantes se detectaba un menor número de bacterias intracelulares a 2 hpi que se continuaba, sin embargo, con un mayor número de viables a 24 y 48 hpi (**Fig. 25B**). Este comportamiento se asemejaba al del mutante sencillo $\Delta STM1940$, que presentaba un ligero aumento en el número de bacterias viables intracelulares en todos los tiempos post-infección (**Fig. 26A**) aunque sin diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) respecto a la estirpe silvestre (**Fig. 26B, 26C**). El análisis de la morfología de este mutante $\Delta STM1940$ no presenta diferencias respecto a la estirpe silvestre (**Fig. 26D**).

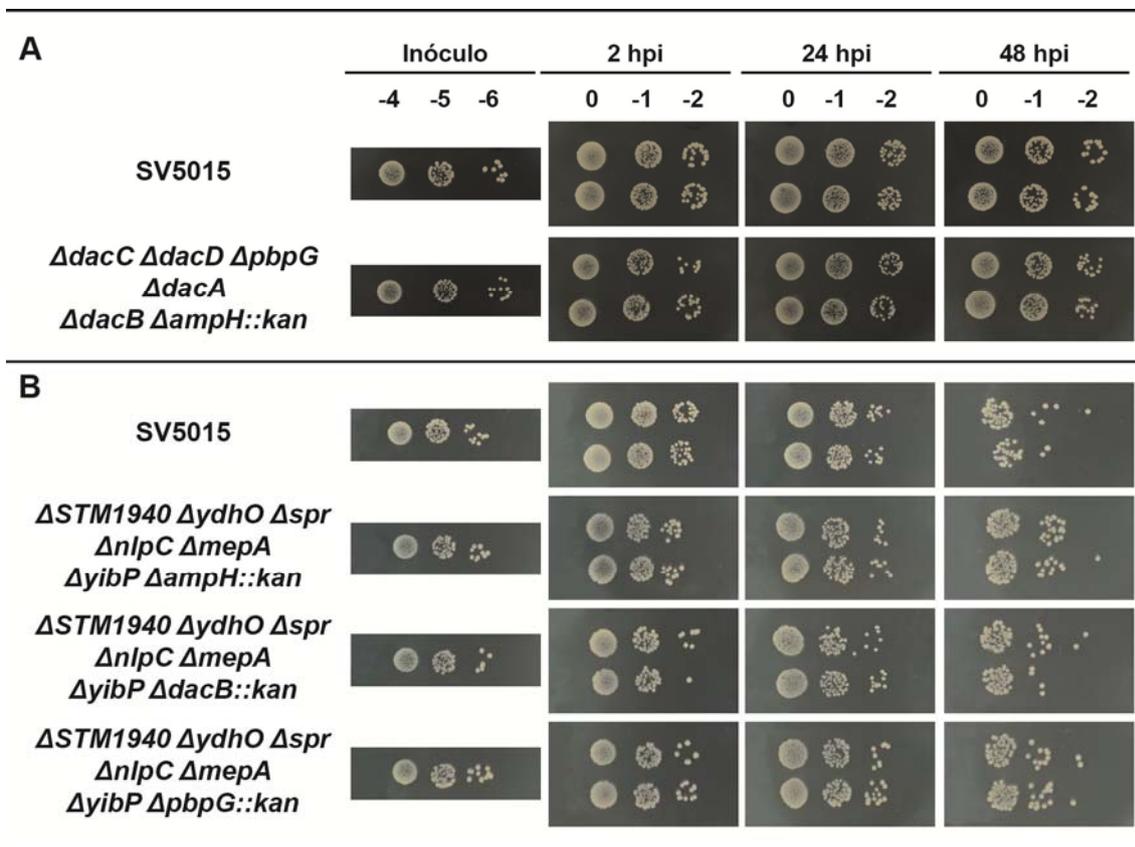


Figura 25. Estimación mediante el ensayo de “gota” de las tasas de invasión y crecimiento intracelular en fibroblastos de rata NRK-49F de mutantes múltiples de *S. Typhimurium* deficientes en enzimas de modificación (MOD) del peptidoglicano. Estas estirpes están descritas en la **Tabla 4**. Cada uno de los mutantes se representa respecto a la estirpe silvestre SV5015 (SL1344 His+). El control negativo $\Delta rpoE$, con una rápida caída de viabilidad, se muestra en la **figura 21**. Las imágenes corresponden a un experimento representativo de un total de tres repeticiones biológicas independientes.

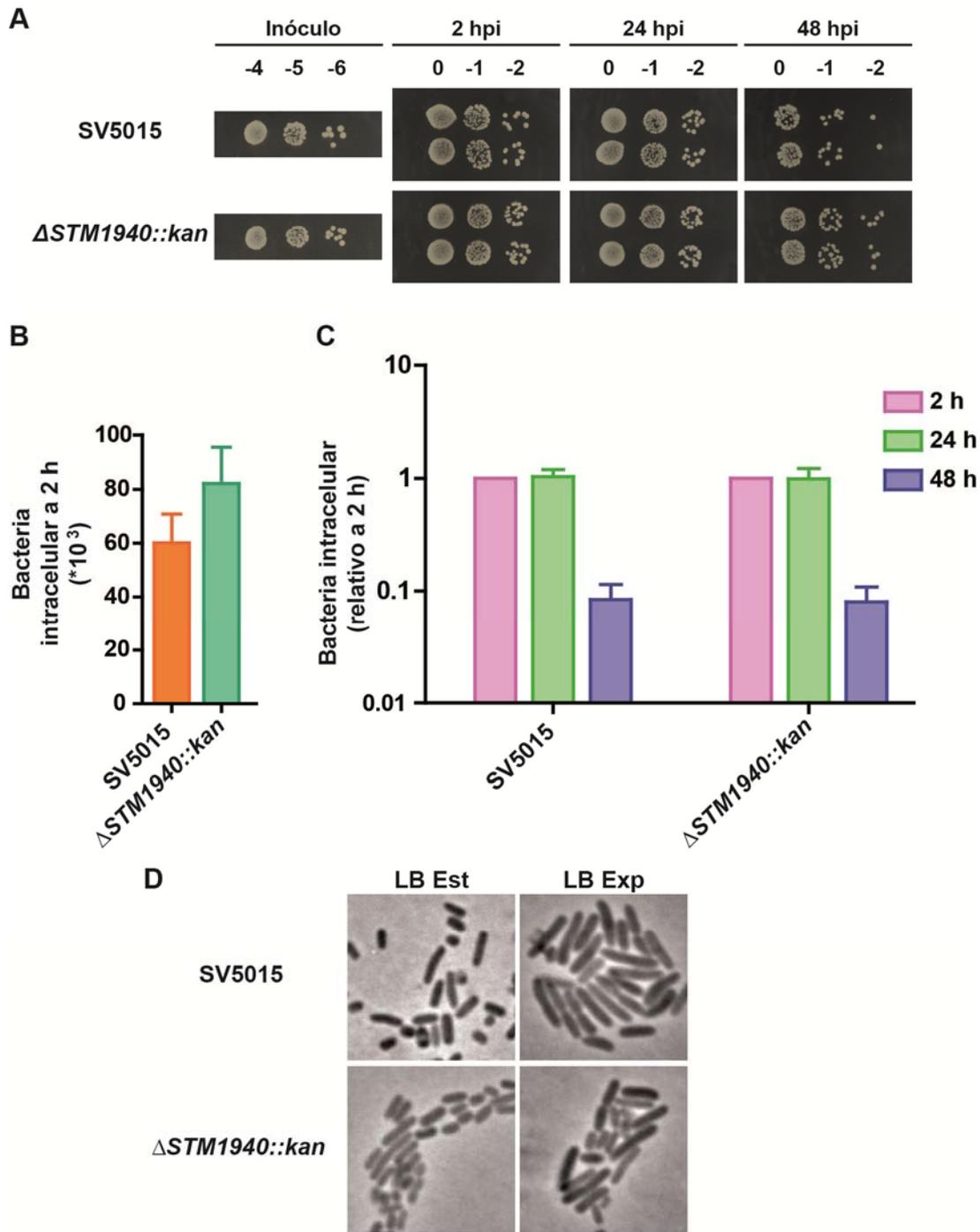


Figura 26. Ensayo de “gota”, tasas de invasión y crecimiento intracelular en fibroblastos de rata NRK-49F y, morfología del mutante de *S. Typhimurium* $\Delta STM1940::kan$. **A:** ensayos de “gota” del mutante $\Delta STM1940::kan$ representado respecto a la estirpe silvestre SV5015 (SL1344 His+). El control negativo $\Delta rpoE$, con una rápida caída de viabilidad, se muestra en la **figura 21**. Las imágenes corresponden a un experimento representativo de un total de tres repeticiones biológicas independientes. **B:** bacteria intracelular viable a las 2 hpi, indicativo de la tasa de invasión. **C:** tasa de proliferación intracelular (Ipro) del mutante, resultante de calcular el cociente entre el número de bacterias intracelulares viables a las 24 o 48 hpi frente a las 2 hpi. Se realizó el análisis estadístico de los datos mediante el test t de Student comparando la media del mutante con la de la estirpe silvestre no existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Los valores mostrados corresponden a la media y la desviación estándar relativos a la estirpe silvestre de un mínimo de tres experimentos independientes. **D:** estudio de la morfología del mutante $\Delta STM1940::kan$ para el que no se observaron diferencias respecto a la estirpe silvestre. LB Est: bacteria en fase estacionaria, medio LB, 18 h a 37°C sin agitación; LB Exp: bacteria en medio LB, en fase exponencial ($DO_{600} \sim 0,2$), a 37°C y con agitación. Barra de aumento: 5 μm .

El análisis morfológico de los mutantes de este grupo funcional MOD, mostró que la estirpe $\Delta dacC \Delta dacD \Delta pbpG \Delta dacA \Delta dacB \Delta ampH::kan$ presenta una morfología alterada (**Fig. 27**), efecto que podría deberse a la deficiencia en la PBP 5 (*dacA*), tal como se describió en *E. coli* (de Pedro *et al.*, 2003). Adicionalmente, los otros mutantes múltiples de este grupo MOD: $\Delta STM1940 \Delta ydhO \Delta spr \Delta nlpC \Delta mepA \Delta yibP$ con deficiencia, además, en una séptima enzima, bien AmpH, DacB o PBP 7 (*pbpG*), mostraron, sin embargo, un defecto parcial en su capacidad para dividirse, ya que en todos ellos se observaba una longitud media claramente más alta (**Fig. 27**).

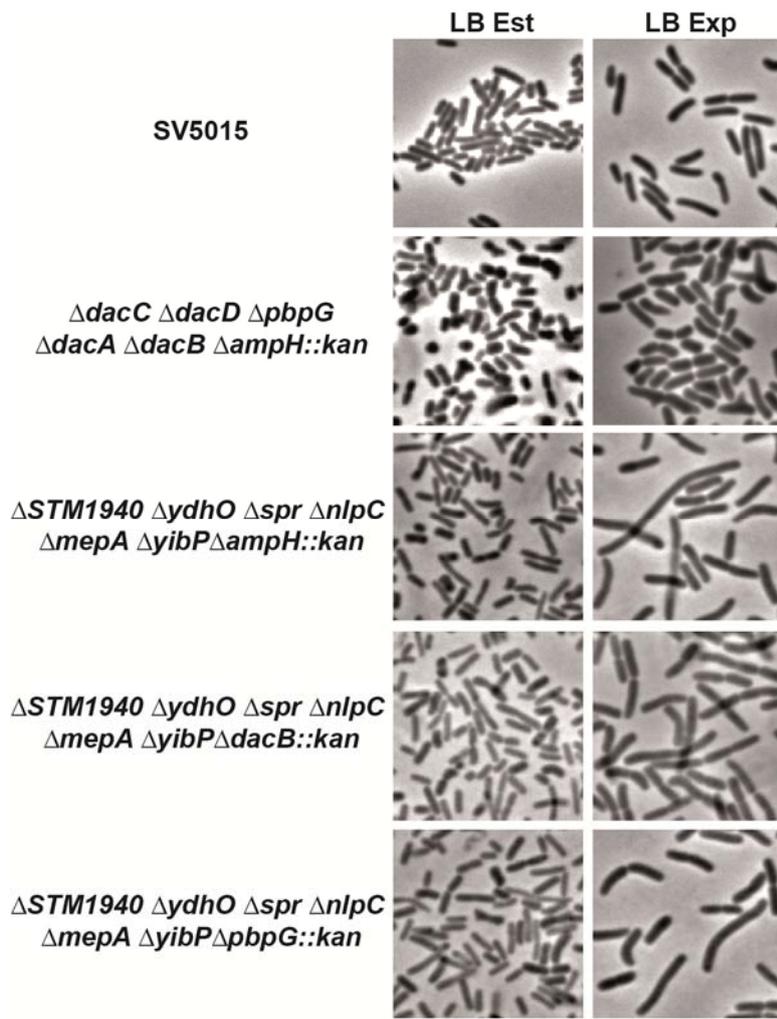


Figura 27. Morfología de los mutantes múltiples de *S. Typhimurium* con deficiencias en enzimas implicadas en la modificación (MOD) del peptidoglicano. Las estirpes empleadas están descritas en la **Tabla 4**. LB Est: bacteria en fase estacionaria, medio LB, 18 h a 37°C sin agitación; LB Exp: bacteria en medio LB, en fase exponencial ($DO_{600} \sim 0,2$), a 37°C y con agitación. Barra de aumento: 5 μm .

Los ensayos de infección en “gota” realizados con mutantes carentes de enzimas que participan en la hidrólisis (HID) del peptidoglicano mostraron igualmente diferencias respecto a la estirpe silvestre (**Fig. 28**). El primer mutante múltiple a destacar es el mutante en TLs con el genotipo $\Delta slt \Delta mltD \Delta emtA \Delta mltC-nupG::kan$. Este mutante crece formando largos filamentos (**Fig. 29**) de modo que es incapaz de invadir las células eucariotas. Por esta razón, no se muestra el ensayo de “gota” en la **figura 28**. Comprobamos que el crecimiento filamentosos de este mutante $\Delta slt \Delta mltD \Delta emtA \Delta mltC-nupG::kan$ se debía a esta combinación particular de mutaciones. Así, la adición de una cuarta mutación tras $\Delta slt \Delta mltD \Delta emtA$ que no sea $\Delta mltC-nupG::kan$

($\Delta STM4216-4218::kan$, $\Delta mltF::kan$, $\Delta mltA::kan$ o $\Delta mltB::kan$) no provoca el crecimiento en filamentos (**Fig. 29**). Este crecimiento formando filamentos tampoco puede ser atribuible a *emtA* ya que un mutante $\Delta slt \Delta mltD \Delta mltC-nupG::kan$ tampoco filameta.

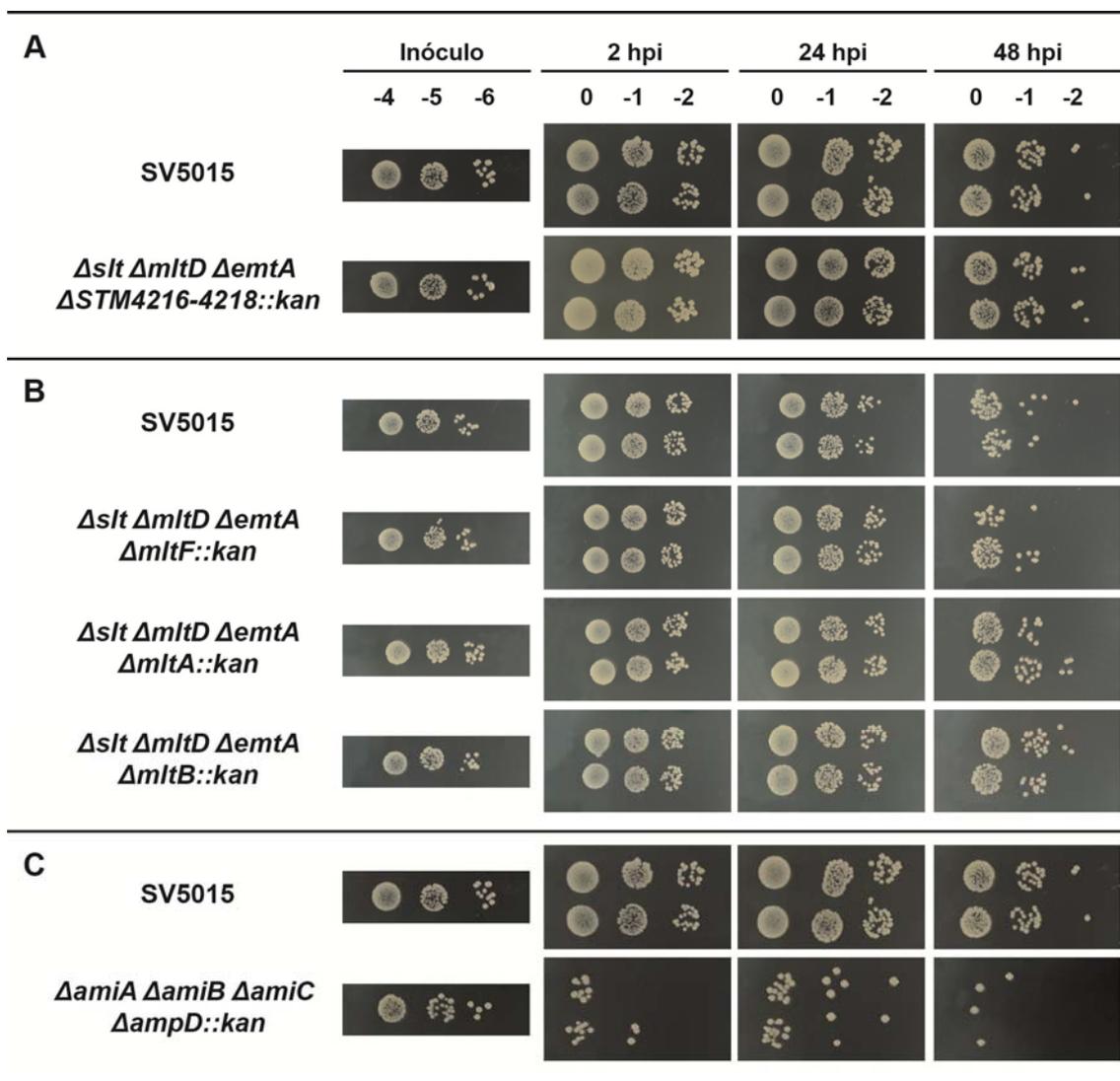


Figura 28. Estimación mediante el ensayo de “gota” de las tasas de invasión y crecimiento intracelular en fibroblastos de rata NRK-49F de mutantes múltiples de *S. Typhimurium* deficientes en enzimas de hidrólisis (HID) del peptidoglicano. Estas estirpes están descritas en la **Tabla 4**. Cada uno de los mutantes está representado respecto a la estirpe silvestre SV5015 (SL1344 His+). El control negativo $\Delta rpoE$, con una rápida caída de viabilidad, se muestra en la **figura 21**. Las imágenes corresponden a un experimento representativo de un total de tres repeticiones biológicas independientes.

Los ensayos de “gota” mostraron que otros mutantes carentes de varias TLs, como $\Delta slt \Delta mltD \Delta emtA \Delta mltA::kan$ y $\Delta slt \Delta mltD \Delta emtA \Delta mltB::kan$, parecen proliferar más a 48 hpi así que analizamos sus índices de invasión y proliferación. Estas pruebas, sin embargo, no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) (**Fig. 30**).

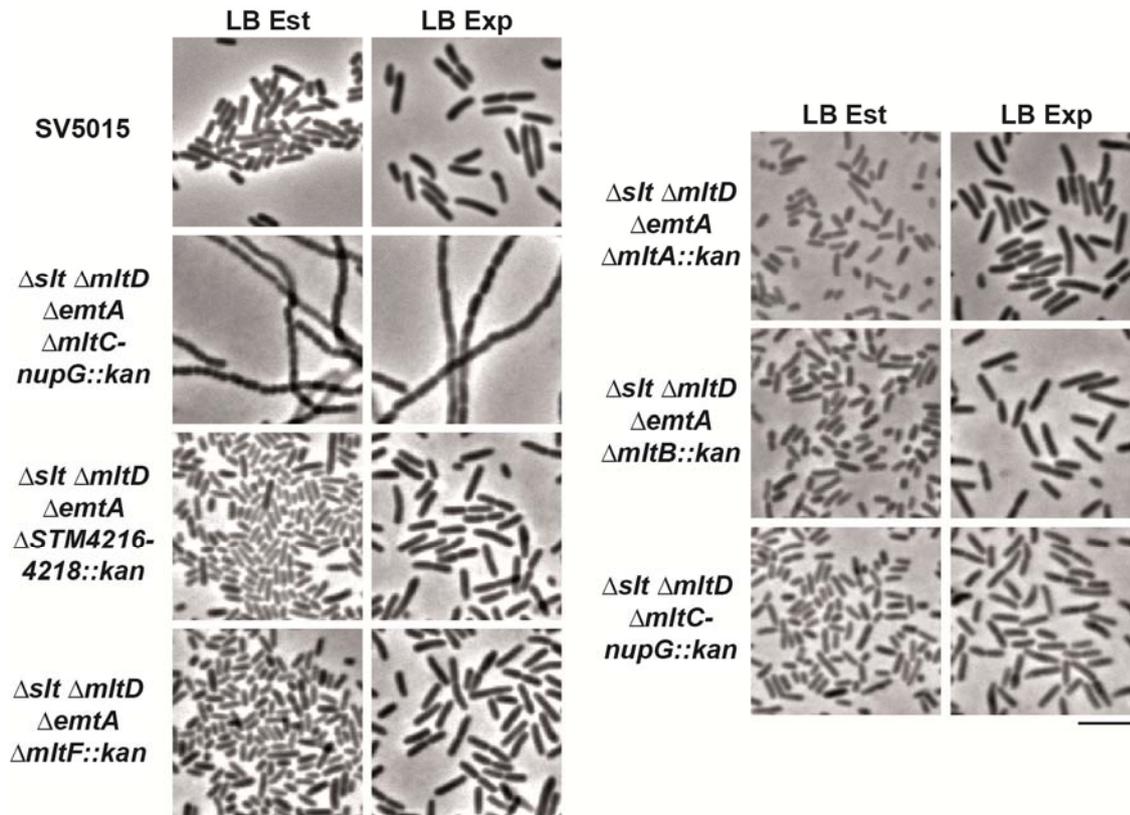


Figura 29. Morfología de los mutantes múltiples de *S. Typhimurium* con deficiencias en enzimas de hidrólisis (HID) del peptidoglicano. Las estirpes empleadas están descritas en la **Tabla 4**. LB Est: bacteria en fase estacionaria, medio LB, 18 h a 37°C sin agitación; LB Exp: bacteria en medio LB, en fase exponencial ($DO_{600} \sim 0,2$), a 37°C y con agitación. Barra de aumento: 5 μm .

Tabla 5. Estirpes de *S. Typhimurium* con deficiencias en una o varias amidasas (Ami) (*)

Estirpe	Genotipo
MD2541	$\Delta\text{amiA}::\text{kan}$
MD2542	$\Delta\text{amiB}::\text{kan}$
MD2530	$\Delta\text{amiC}::\text{kan}$
MD2550	$\Delta\text{ampD}::\text{kan}$
MD3830	$\Delta\text{amiA} \Delta\text{amiB}::\text{kan}$
MD3952	$\Delta\text{amiA} \Delta\text{amiC}::\text{kan}$
MD3953	$\Delta\text{amiA} \Delta\text{ampD}::\text{kan}$
MD3964	$\Delta\text{amiB} \Delta\text{amiC}::\text{kan}$
MD3955	$\Delta\text{ampD} \Delta\text{amiC}::\text{kan}$
MD3956	$\Delta\text{ampD} \Delta\text{amiB}::\text{kan}$
MD3903	$\Delta\text{amiA} \Delta\text{amiB} \Delta\text{amiC}::\text{kan}$
MD3906	$\Delta\text{amiA} \Delta\text{amiB} \Delta\text{amiC} \Delta\text{ampD}::\text{kan}$

(*) Todas las estirpes son isogénicas de la parental SV5015 (SL1344 His+).

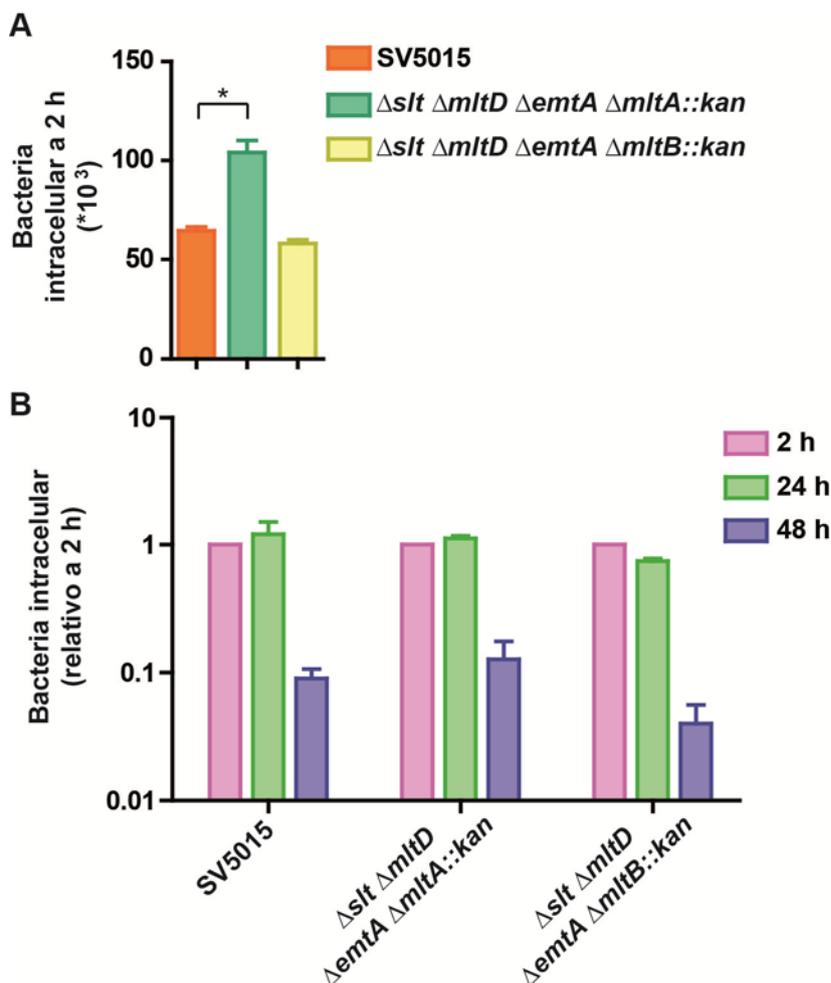


Figura 30. Tasas de invasión y proliferación intracelular en fibroblastos NRK-49F de mutantes múltiples de *S. Typhimurium* en genes que codifican transglicosilasas líticas (TLs). **A:** número de bacterias intracelulares viables a las 2 hpi, indicativo de la tasa de invasión. El análisis estadístico mediante el test t de Student muestra que el mutante $\Delta slt \Delta mltD \Delta emtA \Delta mltA::kan$ presenta un aumento estadísticamente significativo en su tasa de invasión respecto a la estirpe silvestre, $*p < 0,05$. **B:** tasa de proliferación intracelular (ipro) del mutante, resultante de calcular el cociente entre el número de bacterias intracelulares viables a las 24 o 48 hpi frente a las 2 hpi. Se realizó el análisis estadístico de los datos mediante ANOVA de una vía y post-test de Tukey, comparando las medias de los mutantes entre ellas y con la de la estirpe silvestre y no existían diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Los valores mostrados corresponden a la media y la desviación estándar relativos a la estirpe silvestre de un mínimo de tres experimentos independientes.

Por otro lado, dentro del grupo de enzimas de hidrólisis del peptidoglicano (HID), cabe destacar el mutante de amidasas $\Delta amiA \Delta amiB \Delta amiC \Delta ampD::kan$. Este mutante tiene muy reducida su capacidad de invasión de fibroblastos ya que a las 2 hpi ya se observa un número muy bajo de bacterias intracelulares (**Fig. 28C**). Cuando realizamos el análisis de la morfología, este mutante crece formando largos filamentos (**Fig. 31**), apoyando observaciones ya publicadas en *E. coli* que indican que la actividad amidasa es fundamental para la remodelación del peptidoglicano durante la división (Priyadarshini *et al.*, 2007). Para definir cuál de las amidasas (AmiA, AmiB, AmiC o AmpD) es la responsable principal de este fenotipo de filamentación, se construyeron mutantes deficientes en dos o tres de estas amidasas (**Tabla 5**).

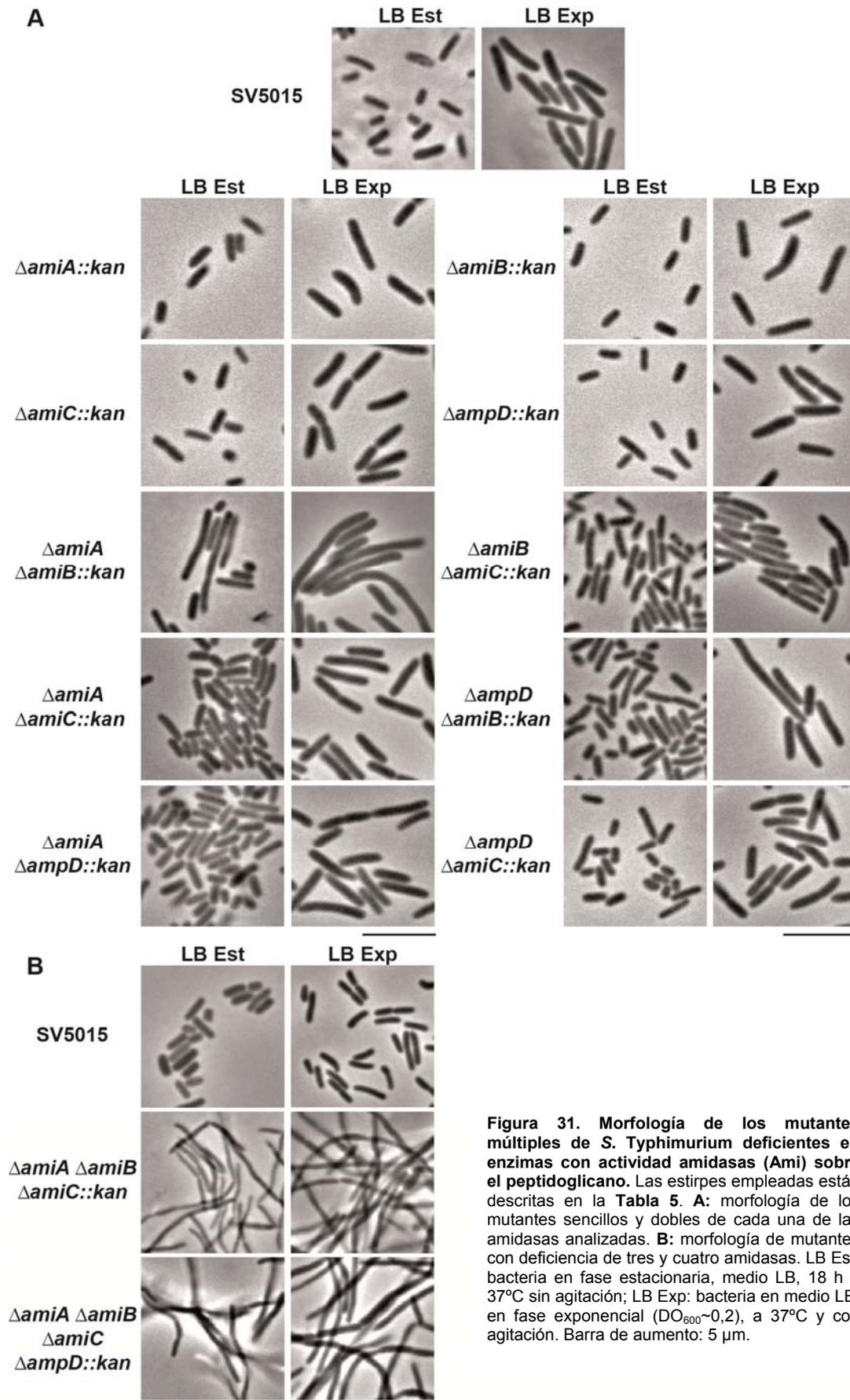


Figura 31. Morfología de los mutantes múltiples de *S. Typhimurium* deficientes en enzimas con actividad amidasas (Ami) sobre el peptidoglicano. Las estirpes empleadas están descritas en la **Tabla 5**. **A**: morfología de los mutantes sencillos y dobles de cada una de las amidasas analizadas. **B**: morfología de mutantes con deficiencia de tres y cuatro amidasas. LB Est: bacteria en fase estacionaria, medio LB, 18 h a 37°C sin agitación; LB Exp: bacteria en medio LB, en fase exponencial ($DO_{600} \sim 0,2$), a 37°C y con agitación. Barra de aumento: 5 μm .

Mientras que la deficiencia de una de estas amidasas no alteró la morfología de la bacteria (Fig. 31A), la pérdida de dos de estas amidasas causa un defecto parcial en el proceso de división, siendo más acusado en el doble mutante $\Delta amiA \Delta amiB::kan$ (Fig. 31A). Por otro lado, la ausencia simultánea de las amidasas AmiA, AmiB y AmiC conduce a filamentación en la totalidad de la población (Fig. 31B). Estas observaciones nos llevaron a realizar el ensayo de infección de “gota” únicamente con los dobles mutantes, los cuales, debido a su morfología relativamente poco alterada (Fig. 31A), tendrían mayor capacidad de invasión. Estos ensayos mostraron que el mutante $\Delta amiA \Delta amiB::kan$ forma colonias de mayor tamaño que la estirpe parental, un fenotipo probablemente asociado a su propensión a filamentar (Fig. 32). Otros resultados interesantes fueron la menor tasa de invasión del doble mutante $\Delta amiA \Delta amiB::kan$ (Fig. 33A) así como un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,01$) en su tasa de proliferación intracelular a 24 y 48 hpi (Fig. 33 B).

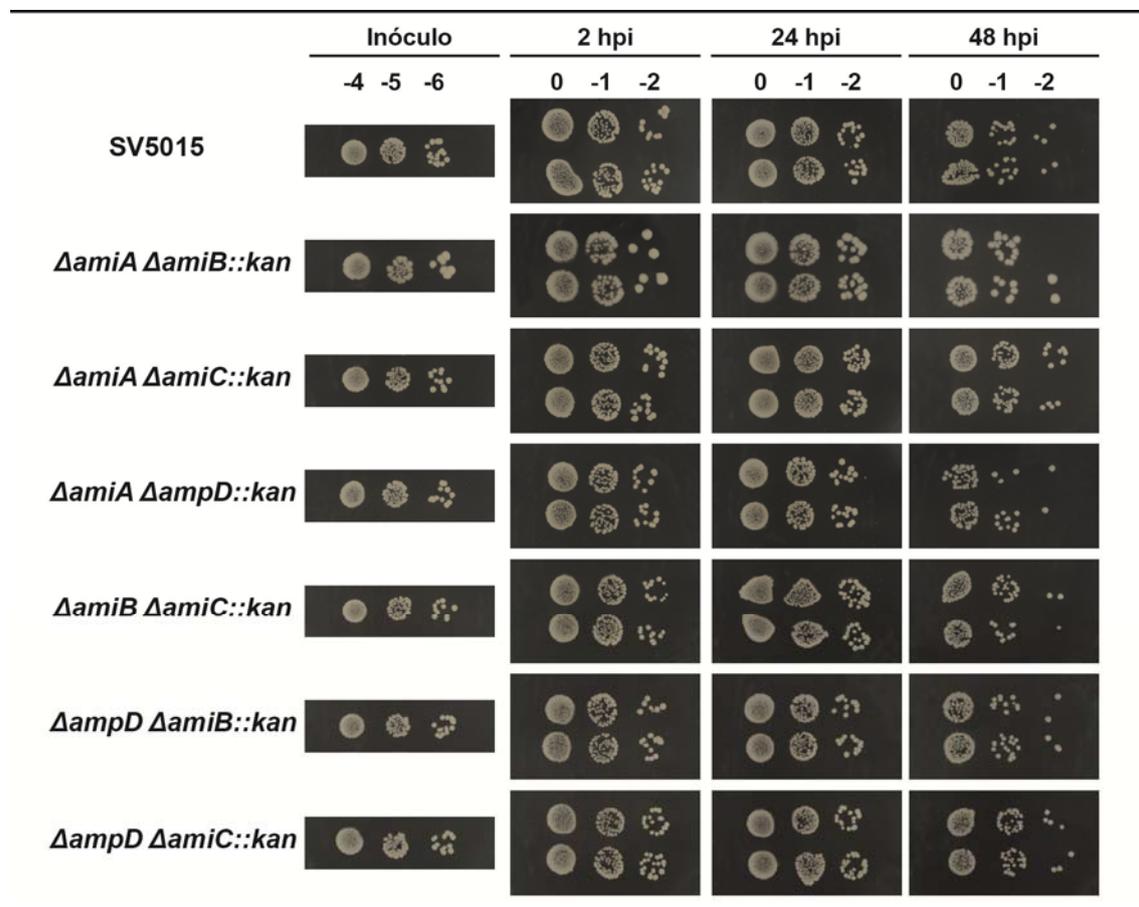


Figura 32. Estimación mediante el ensayo de “gota” de las tasas de invasión y crecimiento intracelular en fibroblastos de rata NRK-49F de mutantes múltiples de *S. Typhimurium* deficientes en enzimas con actividad amidasa (Ami). Estas estirpes están descritas en la Tabla 5. Cada uno de los mutantes está representado respecto a la estirpe silvestre SV5015 (SL1344 His+). El control negativo $\Delta rpoE$, con una rápida caída de viabilidad, se muestra en la figura 21. Las imágenes corresponden a un experimento representativo de un total de tres repeticiones biológicas independientes.

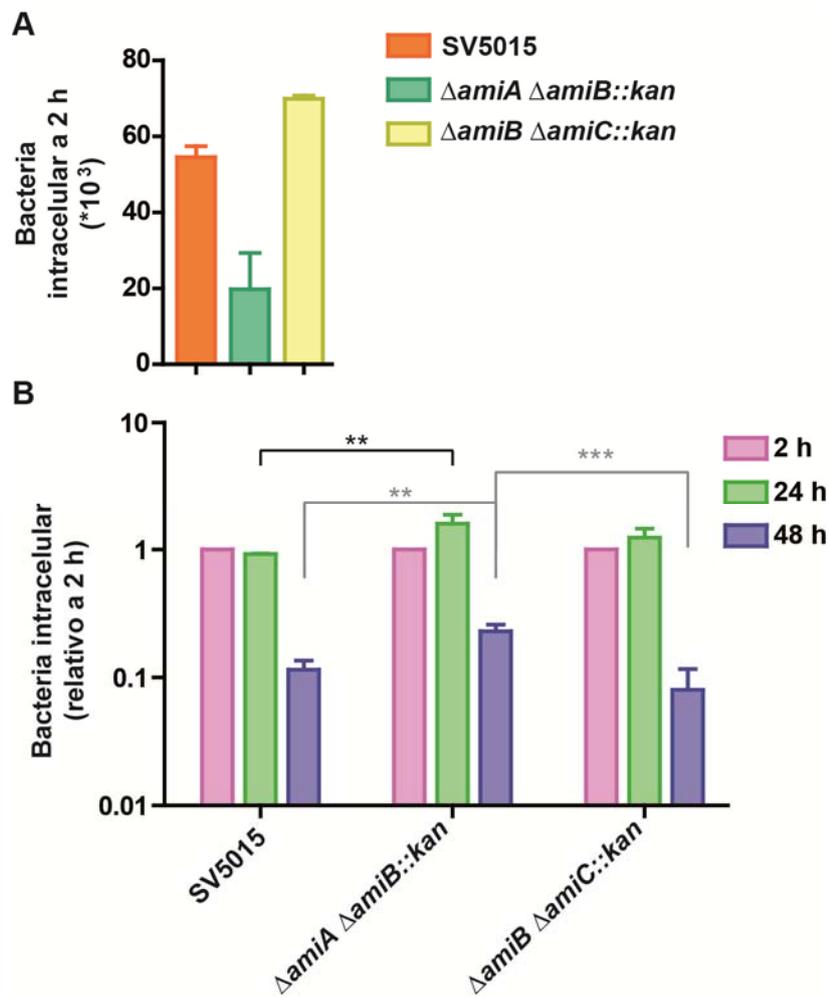


Figura 33. Tasas de invasión y proliferación intracelular en fibroblastos NRK-49F de mutantes múltiples de *S. Typhimurium* en genes que codifican amidasas (Ami). **A:** número de bacterias intracelulares viables a las 2 hpi, indicativo de la tasa de invasión. **B:** tasa de proliferación intracelular (Ipro) de los mutantes, resultante de calcular el cociente entre el número de bacterias intracelulares viables a las 24 o 48 hpi frente a las 2 hpi. Análisis estadístico de los datos mediante ANOVA de una vía y post-test de Tukey, comparando las medias de los mutantes entre ellas y con la de la estirpe silvestre. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Los valores mostrados corresponden a la media y la desviación estándar relativos a la estirpe silvestre de un mínimo de tres experimentos independientes.

Los estudios posteriores los dirigimos a la caracterización de mutantes múltiples deficientes en enzimas del reciclaje (REC) del peptidoglicano. Los resultados obtenidos en los ensayos de “gota” para el mutante múltiple $\Delta ampD \Delta ldcA \Delta nagZ::kan$, mostraron un aparente descenso en el número de bacterias intracelulares a todos los tiempos post-infección (**Fig. 34A**). No obstante, los ensayos de invasión y proliferación intracelular no mostraron diferencias significativas (**Fig. 34C y 34D**). Este mutante $\Delta ampD \Delta ldcA \Delta nagZ::kan$ tampoco mostró alteraciones morfológicas (**Fig. 34B**). El motivo por el que el gen *ampG* no fue incluido en mutantes múltiples de enzimas implicadas en el reciclaje del peptidoglicano fue la letalidad para *S. Typhimurium* de la carencia de este gen. Por otro lado, no se incluyó el gen *mpl* en estos mutantes ya que, aunque implicado en el reciclaje, su función es la de facilitar la síntesis de precursores desde moléculas recicladas. En lo que respecta a *ycjI*, su errónea clasificación inicial como amidasa nos impidió incluirla en este ensayo.

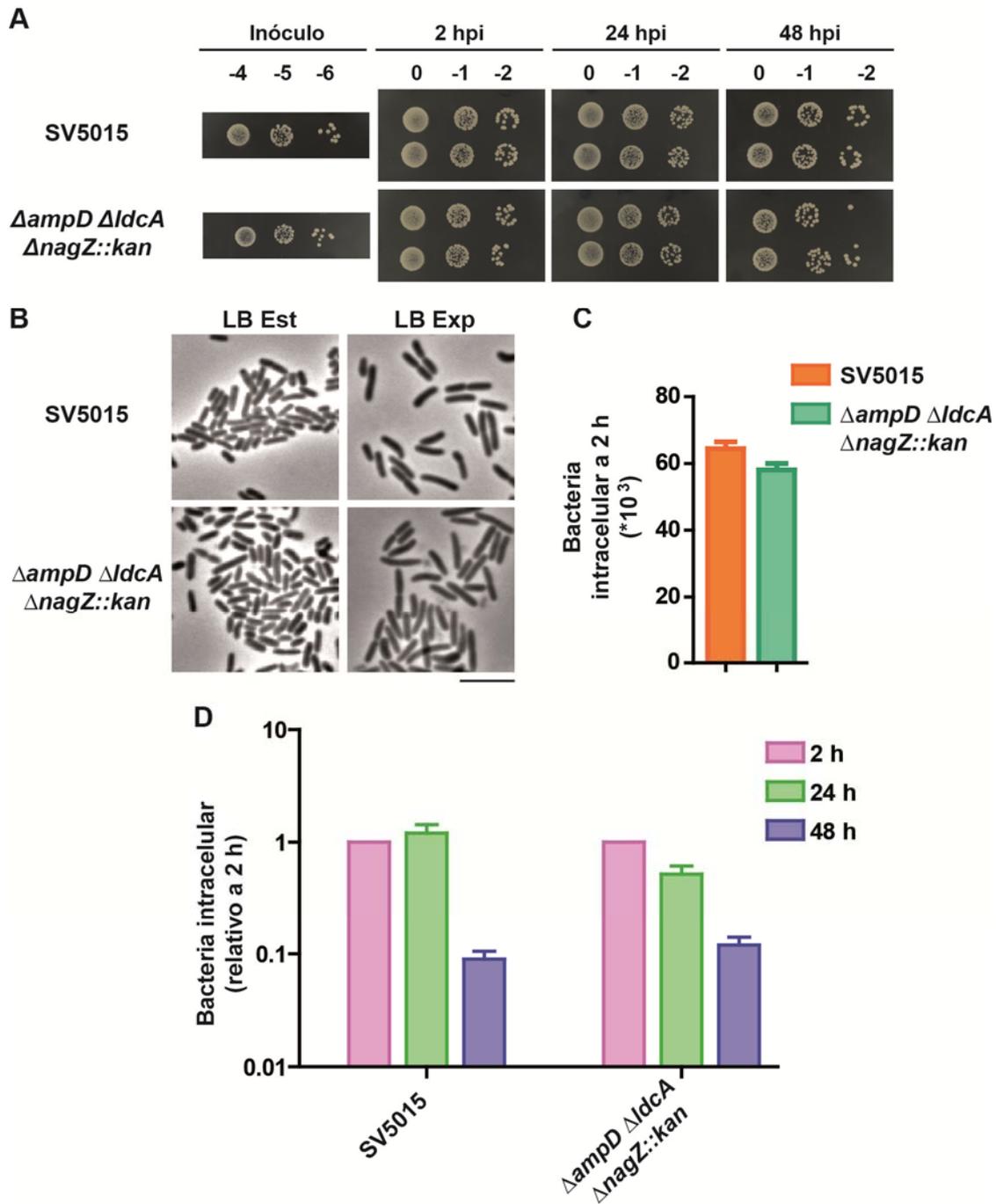


Figura 34. Ensayo de “gota”, tasas de invasión y crecimiento intracelular en fibroblastos de rata NRK-49F y, morfología del mutante de *S. Typhimurium* deficiente en enzimas del reciclaje (REC) del peptidoglicano. La estirpe de *S. enterica* serovar Typhimurium empleada es deficiente en los genes con actividad REC: $\Delta ampD \Delta ldcA \Delta nagZ::kan$. **A:** ensayos de “gota” del mutante $\Delta STM1940::kan$ representado respecto a la estirpe silvestre SV5015 (SL1344 His+). El control negativo $\Delta rpoE$, con una rápida caída de viabilidad, se muestra en la **figura 21**. Las imágenes corresponden a un experimento representativo de un total de tres repeticiones biológicas independientes. **B:** estudio de la morfología del mutante $\Delta STM1940::kan$ para el que no se observaron diferencias respecto a la estirpe silvestre. LB Est: bacteria en fase estacionaria, medio LB, 18 h a 37°C sin agitación; LB Exp: bacteria en medio LB, en fase exponencial ($DO_{600} \sim 0,2$), a 37°C y con agitación. Barra de aumento: 5 μm . **C:** bacteria intracelular viable a las 2 hpi, indicativo de la tasa de invasión. **D:** tasa de proliferación intracelular (I_{pro}) del mutante, resultante de calcular el cociente entre el número de bacterias intracelulares viables a las 24 o 48 hpi frente a las 2 hpi. Se realizó el análisis estadístico de los datos mediante t de Student comparando la media del mutante con la de la estirpe silvestre siendo $p > 0,05$. Los valores mostrados corresponden a la media y la desviación estándar relativos a la estirpe silvestre de un mínimo de tres experimentos independientes.

3.2.2 Ensayos de mutantes múltiples carentes de enzimas del metabolismo del peptidoglicano abundantes en *S. Typhimurium* intracelular

Los ensayos de infección en el formato “gota” realizados con las estirpes que presentan deficiencia simultánea de enzimas cuya expresión es elevada en condiciones intracelulares (**Tabla 6**), no mostraron alteraciones significativas en el número de bacterias intracelulares a ningún tiempo post-infección (**Fig. 35**). El estudio de la morfología de esta colección de mutantes múltiples puso de nuevo de manifiesto que en todas las estirpes deficientes en la PBP 5 (*dacA*) se producían alteraciones en la forma de la bacteria (**Fig. 36**). Sin embargo, no se apreciaron otros cambios que pudiéramos asociar al resto de enzimas que habían sido eliminadas en esta serie de mutantes.

La ausencia de un fenotipo claro en el modelo de infección persistente en fibroblastos nos indicaba que, aunque la gran mayoría de enzimas del metabolismo del peptidoglicano son sintetizadas por la bacteria en el ambiente intracelular, ninguna de ellas juega un papel esencial por si sola para el mantenimiento de la integridad de la bacteria en el interior de la célula eucariota.

Tabla 6. Colección de mutantes múltiples de *S. Typhimurium* con deficiencia simultánea en genes que codifican enzimas del peptidoglicano con altos niveles de producción en bacteria intracelular (*)

Genotipo
<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG ΔSTM1910::kan</i>
<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG Δ STM1836::kan</i>
<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG Δ STM1940::kan</i>
<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG ΔdacA ΔdacB::kan</i>
<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG ΔdacA ΔdacB ΔmrcA::kan</i>
<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG ΔdacA ΔdacB ΔmrcB::kan</i>
<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG ΔdacA ΔdacB Δ STM1910 Δ STM1836::kan</i>
<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG ΔmltD ΔmtgA ΔmltA::kan</i>
<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG ΔmltD ΔmtgA ΔybiS::kan</i>

(*) Todas las estirpes son isogénicas de la parental SV5015 (SL1344 His+). Los niveles de producción de estas enzimas están mostrados en las **figuras 16-19**.

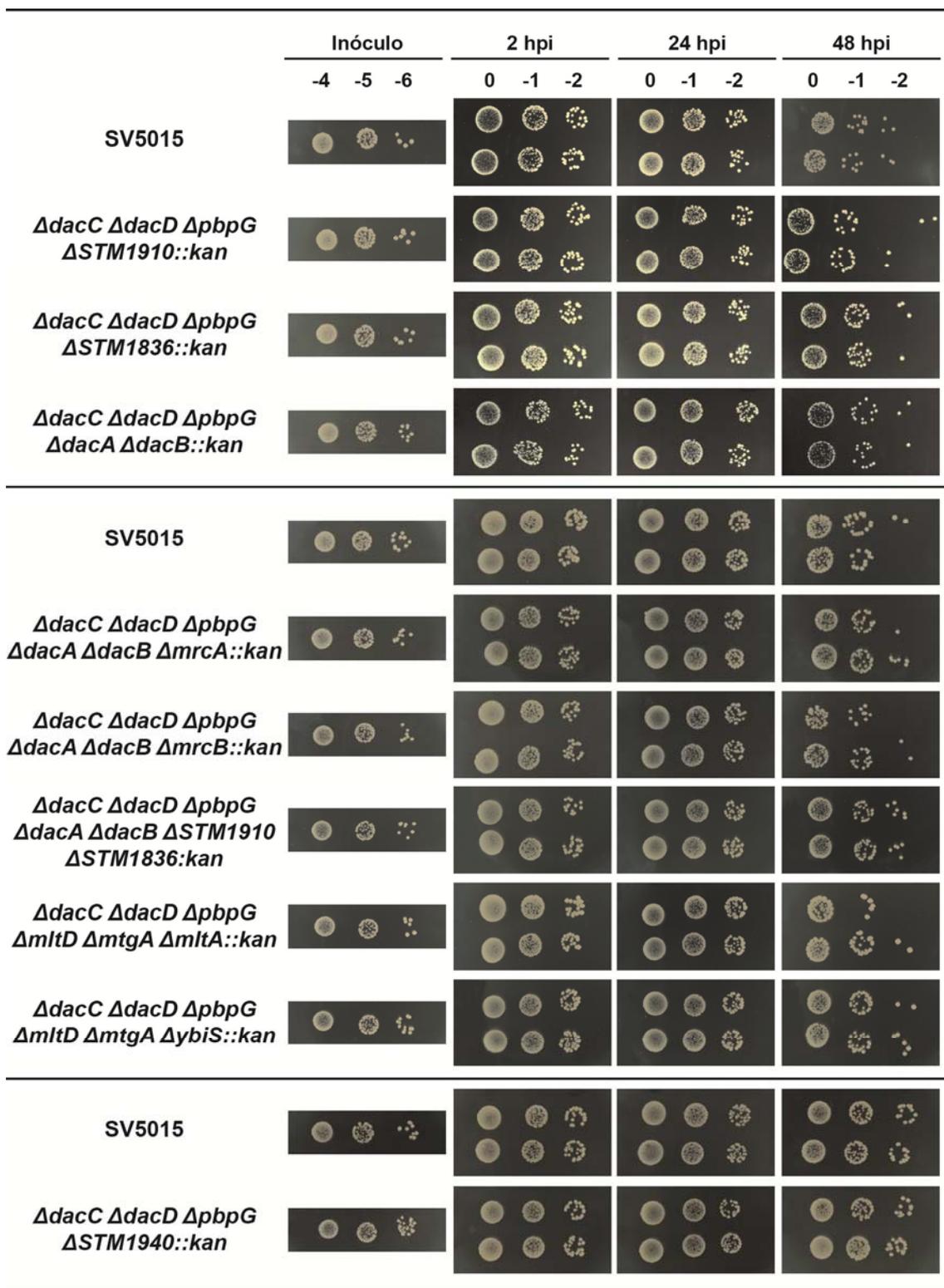


Figura 35. Estimación mediante el ensayo de “gota” de las tasas de invasión y crecimiento intracelular en fibroblastos de rata NRK-49F de mutantes múltiples de *S. Typhimurium* deficientes en enzimas producidas a altos niveles por bacteria intracelular. Estos mutantes están descritas en la **Tabla 6** y se muestran respecto a la estirpe silvestre SV5015 (SL1344 His+). El control negativo $\Delta\rho E$, con una rápida caída de viabilidad, se muestra en la **figura 21**. Las imágenes corresponden a un experimento representativo de un total de tres repeticiones biológicas independientes.

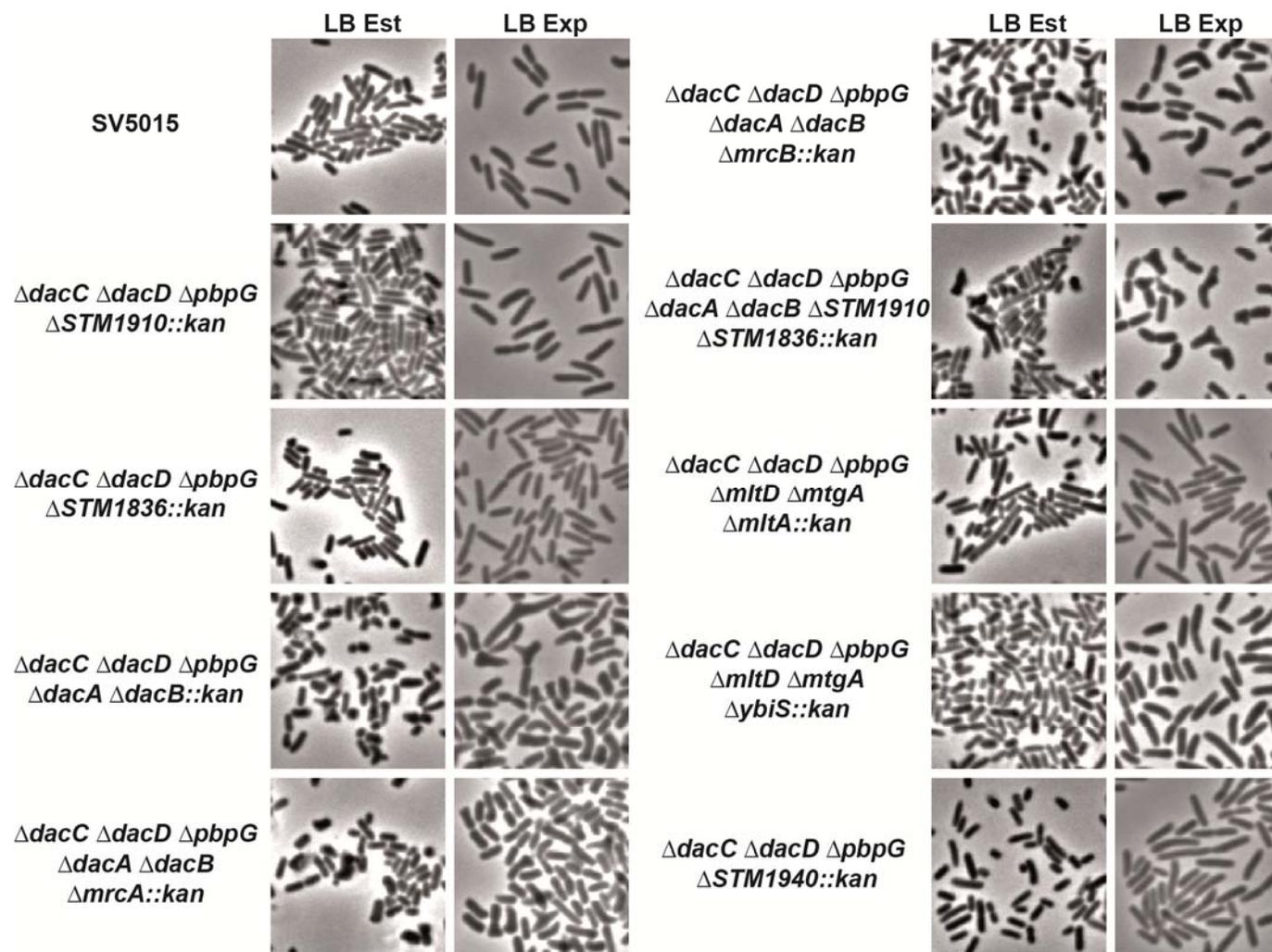


Figura 36. Morfología de los mutantes múltiples de *S. Typhimurium* deficientes en enzimas producidas a altos niveles por bacteria intracelular. Las estirpes empleadas están descritas en la **Tabla 6**. LB Est: bacteria en fase estacionaria, medio LB, 18 h a 37°C sin agitación; LB Exp: bacteria en medio LB, en fase exponencial ($DO_{600} \sim 0,2$), a 37°C y con agitación. Barra de aumento: 5 μm .

CAPÍTULO 4

Estructura del peptidoglicano de *S. enterica* serovar Typhimurium

La estructura del peptidoglicano es un reflejo de la condición ambiental en la que se encuentra una bacteria. Numerosos trabajos muestran que, todo cambio ambiental o de estado de crecimiento que experimenta la bacteria, se traduce en alteraciones en la estructura del peptidoglicano. Dado nuestro interés en conocer qué cambios se producen en esta macromolécula durante la infección intracelular, estudiamos su estructura en la transición del exterior al interior de la célula eucariota. Este análisis se inició con mutantes carentes de enzimas conocidas por su participación en el metabolismo del peptidoglicano y se continuó con un análisis en bacteria intracelular. Desde el punto de vista metodológico, el peptidoglicano se degrada enzimáticamente con una enzima que tiene actividad muramidasa y, por tanto, rompe la cadena glucídica. Como resultado, se obtienen muropeptidos que son diferenciables por su distinto tiempo de retención en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Desmarais *et al.*, 2013). Esta técnica permitió la identificación de hasta un total de ochenta muropeptidos diferentes en *E. coli* (Glauner *et al.*, 1988). Por lo tanto, la cuantificación mediante HPLC de la densidad de entrecruzamientos, la longitud de las cadenas glucídicas, y el número de capas dentro de la pared, aporta una información directa de las propiedades físicas de las células.

4.1 Estructura del peptidoglicano de estirpes mutantes en enzimas del peptidoglicano

Se analizó mediante HPLC el perfil de muropeptidos que componen el peptidoglicano de varios mutantes, carentes de actividades enzimáticas implicadas en las últimas etapas de biosíntesis, remodelación, o reciclaje del sáculo (**Tabla 7**). Todos los mutantes se crecieron en los medios LB e ISM hasta una fase de crecimiento exponencial ($DO_{600} \sim 0,5$) con el fin de detectar posibles cambios en la fase activa de crecimiento, en la que se produce una tasa más alta de incorporación y recambio de material en el peptidoglicano. Los porcentajes relativos de cada uno de los tipos de muropeptidos (monómeros, dímeros y trímeros), permiten calcular el grado de entrecruzamiento del peptidoglicano así como la longitud media de las cadenas de azúcares en cada una de las muestras. Esta información, comparada con la obtenida para la estirpe silvestre (SV5015), podía permitirnos comprobar si existían cambios estructurales sustanciales como para afectar la interacción del patógeno con células eucariotas. Como muestra la **Tabla 7**, en la que se indica el grado de entrecruzamiento del peptidoglicano de las estirpes mutantes crecidas en medios LB e ISM, la mayoría de los valores caen en un rango de $\pm 5\%$ respecto a la estirpe parental SV5015, con la excepción de los mutantes $\Delta mrcA$ (PBP 1A) y $\Delta pbpG$ (PBP 7) en medio ISM. En estos dos casos, el grado de entrecruzamiento es mayor que el de la estirpe silvestre, siendo un 11,5 % mayor en el caso de $\Delta mrcA$ y un 5,8 % en el caso de $\Delta pbpG$. En conclusión, las mutaciones individuales no provocan cambios importantes en la estructura del peptidoglicano excepto en los casos de $\Delta mrcA$ y $\Delta pbpG$, que presentan un mayor número de enlaces peptídicos en su estructura.

La longitud media de las cadenas glucídicas se calcula basándose en el porcentaje de muropeptidos con un grupo anhídrico en su extremo. Estos muropeptidos anhídricos son minoritarios con respecto al total, por lo que, en ocasiones, apenas se detectan. Además, una pequeña diferencia en su porcentaje provoca un cambio notable en la longitud media estimada. Por ejemplo, en dos ensayos independientes de la estirpe silvestre SV5015 analizados por HPLC, donde la mayoría de los muropeptidos analizados mantienen valores similares, se observa un cambio en el porcentaje molecular de grupos anhídricos del 1,47 % al 0,89 % que llevan a un cambio en la longitud de las cadenas de 68 a 112,2 disacáridos (**Tabla 8**). En esta misma tabla se puede

observar que el mayor cambio entre los dos experimentos es el pentapéptido (M5) que sufre un cambio del 0,39 % al 1,55 % pero que no provoca grandes cambios en el grado de entrecruzamiento que sólo varía de 33,2 a 31,7. Debido a la gran variación en la longitud de cadenas debido a los cambios en los grupos anhídrido, es difícil concluir dicho valor de longitud para los mutantes.

Tabla 7. Grado de entrecruzamiento del peptidoglicano de varios mutantes de *S. Typhimurium* carentes de enzimas implicadas en el metabolismo del peptidoglicano (*)

Estirpe	Grado de Entrecruzamiento (LB Exp)	Grado de Entrecruzamiento (ISM Exp)	Estirpe	Grado de Entrecruzamiento (LB Exp)	Grado de Entrecruzamiento (ISM Exp)
SV5015	33,2	44	$\Delta mltB$	30	45,1
$\Delta mrcA$	32	55,5	$\Delta mltC$	34	43,1
$\Delta mrcB$	34,1	45,7	$\Delta mltD$	33,5	42,9
$\Delta pbpC$	33,1	44,5	$\Delta emtA$	30,9	42,3
$\Delta STM1910$	34,8	46,8	$\Delta slit$	31,8	43,9
$\Delta STM1836$	30	45,4	$\Delta STM4217$	32,9	44
$\Delta mtgA$	34,6	47,4	$\Delta amiA$	34,3	43,7
$\Delta dacB$	37,4	48,8	$\Delta amiB$	32	42,8
$\Delta dacA$	30,4	45,8	$\Delta amiC$	29,1	42,6
$\Delta dacC$	31,6	46,4	$\Delta ampD$	32,9	45,4
$\Delta dacD$	29,8	43	$\Delta nagZ$	31,9	43,8
$\Delta pbpG$	37,9	49,8	$\Delta ldcA$	29	40,4
$\Delta ampH$	34,3	45,8	$\Delta ydhO$	31,1	41,2
$\Delta mepA$	35,2	46,8	$\Delta ycjI$	30,4	40,5

Estirpe	Grado de Entrecruzamiento (LB Est)	Grado de Entrecruzamiento (ISM Est)
SV5015	38,2	53,0
$\Delta STM1940$	38,2	53,5

(*) El peptidoglicano se obtuvo de bacteria crecida en fase exponencial (Exp) hasta $DO_{600} \sim 0,5$ en los medios LB e ISM o en fase estacionaria (Est) hasta una $DO_{600} \sim 2,5$ en medio LB. El grado de entrecruzamiento se determinó aplicando la fórmula descrita en L.5 de Materiales y Métodos que considera la proporción relativa de muropéptidos monómeros, dímeros y trimeros.

Tabla 8. Contenido de muropéptidos identificados por HPLC en dos muestras de la estirpe parental *S. Typhimurium* SV5015 obtenidas en experimentos independientes (*)

Muropéptidos	Exp. 1	Exp. 2
Monómeros	68,82	69,76
Dímeros	29,14	28,75
Trímeros	2,04	1,49
Lpp	10,99	9,19
Anhidro	1,47	0,89
Dap-Dap	4,22	4,23
Pentapéptidos	0,39	1,55
Glicina	3,95	3,31
Entrecruzamiento	33,2	31,7
Longitud media	68	112,2

(*) El peptidoglicano se obtuvo de bacteria crecida en medio LB hasta fase exponencial ($DO_{600} \sim 0,5$), procesándose para análisis de muropéptidos por HPLC según se indica en Materiales y Métodos. La longitud media de las cadenas refiere a unidades disacáridicas (NAcGlc-NAcMur).

4.2 Estructura del peptidoglicano de *S. Typhimurium* SV5015 en bacteria intracelular

Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que cuando *S. Typhimurium* crece activamente en células epiteliales HeLa su peptidoglicano contiene cantidades elevadas de un grupo de muropéptidos que son minoritarios en bacteria extracelular (Quintela *et al.*, 1997). Estos muropéptidos corresponden a dímeros entrecruzados en los cuales faltaba una de las unidades disacáridicas NAcGlc-NAcMur. Este tipo de muropéptido sólo puede generarse como resultado de una actividad NAcMur-L-Ala amidasa. En este modelo de infección, el peptidoglicano de la bacteria intracelular carece de muropéptidos con glicina, presenta un aumento de enlaces peptídicos de tipo LD y un descenso global del entrecruzamiento (Quintela *et al.*, 1997). En su conjunto, estos datos indicaban que *S. Typhimurium* podría remodelar su peptidoglicano para adaptarse al ambiente intracelular de la célula eucariota.

A partir de estos datos, nuestro objetivo, en el modelo de infección persistente de fibroblastos, era analizar si la estructura del peptidoglicano de *S. Typhimurium* sufre algún tipo de modificación, similar o diferente a las que experimenta la bacteria intracelular que prolifera activamente.

El abordaje de este objetivo fue laborioso a nivel metodológico. La principal dificultad fue la obtención de un número de bacterias intracelulares suficiente para que, tras la extracción de su peptidoglicano, se obtuviera la cantidad de muestra necesaria para su análisis mediante HPLC. Con este objetivo, se utilizaron un total de 180 placas de cultivo de 500 cm² de superficie (p500) en las que se crecieron fibroblastos humanos BJ-5ta que fueron posteriormente infectados con la estirpe silvestre de *S. Typhimurium* SV5015. Además de la preparación de peptidoglicano de bacteria intracelular (tras 24 h de infección), también se obtuvo peptidoglicano de bacteria extracelular crecida a 37°C, durante 18 h y sin agitación tanto en LB como en Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Estas condiciones de crecimiento en medio LB son las utilizadas para crecer la bacteria que se utiliza en la infección (véase Materiales y Métodos). Con respecto al medio DMEM, éste es el medio en el que se cultivan las células eucariotas y se empleó para descartar posibles cambios en la estructura del peptidoglicano intracelular debidos a características propias de este medio y no al transcurso de la infección. En estos análisis de HPLC se señalaron con números los picos correspondientes a muropéptidos de estructura química

conocida y con letras aquellos de nueva aparición en el peptidoglicano de bacteria intracelular, presentando estos últimos un tiempo de retención no relacionado con muropéptidos de estructura conocida. Los muropéptidos conocidos a los que se les asignó un número en el perfil cromatográfico están representados en la **figura 37**. Como muestra la **figura 38**, el contenido de muropéptidos del peptidoglicano es similar en la bacteria crecida en medio LB (**Fig. 38A**) con respecto a la crecida en medio DMEM (**Fig. 38B**). Este resultado nos llevó a tomar el medio LB como condición control para la bacteria extracelular. Las diferencias que se observaron comprendían: i) la aparición de un doble pico (B/B') entre los minutos 19 y 20; y, ii) la aparición de tres picos de tiempo de retención no conocido (D, E, F) previos al pico 9 (**Fig. 38C**). Debido a las cantidades limitadas de peptidoglicano que estaban disponibles para el caso de bacteria intracelular y estirpe silvestre, decidimos repetir el experimento con el mutante *phoP*, el cual muestra una alta tasa de proliferación en el interior de fibroblastos (*Cano et al., 2001*). Se infectaron un total de 144 placas p500 en las que se habían cultivado fibroblastos humanos BJ-5ta (**Fig. 39**). Se indican con letras (A, B/B', C, D, E, F, G, H, I) los muropéptidos de nueva aparición en bacteria intracelular respecto al extracelular. De forma consistente con lo observado en la estirpe silvestre SV5015, el mutante *phoP* obtenido del interior del fibroblasto y en fase activa de crecimiento también contenía el muropéptido B/B' mientras que no era detectado en bacteria extracelular. La confirmación de una estricta asociación entre la aparición del muropéptido B/B' y la adaptación a la vida intracelular en un segundo experimento independiente realizado con la estirpe *phoP* (**Fig. A3** del anexo I), nos llevó a marcar como objetivo su posterior caracterización química. En relación a los otros muropéptidos que se identificaron de forma diferencial en bacteria intracelular (A, B/B', C, D, E, F, G, H, I) se pudo predecir la estructura química de varios de ellos en basa a su masa molecular, obtenida mediante ensayos de espectrometría de masas (**Fig. 40**). Otros compuestos que aparecían en el cromatograma de HPLC tras el minuto 47 de elución de la columna no fueron caracterizados, ya que por ese tiempo tardío de elución, podrían corresponder a restos de las células eucariotas.

Tabla 9A. Relaciones masa/carga (m/z) de los productos obtenidos tras la fragmentación de los muropéptidos M3G y B/B' (*)

Fragmento	M3G	B/B'
Masa parental	928,3904	928,4278
Fr1	725,3129	725,3499
Fr1'	650,2956	650,2902
Fr2	448,1893	448,2325
Fr2'	373,1687	373,1688
Fr3	377,1660	377,2106
Fr3'	302,1331	302,1326
Fr4	248,1242	248,1572
Fr4'	173,0904	173,0892

(*) En negro se representan los fragmentos que presentan la diferencia de 0,03-0,05 Da en su relación m/z referente al aminoácido carboxilo terminal de la cadena peptídica, mientras que en rojo se representan los fragmentos en los que se ha igualado su relación m/z.

Tabla 9B. Relaciones masa/carga (m/z) de los productos obtenidos tras la fragmentación de los muropéptidos M3G y B/B' marcados con ICPL

Fragmento	M3G	B/B'
Masa parental	1037,4508	1037,4861
Fr1	834,3629	834,4026
Fr1'	759,3317	759,3342
Fr2	557,2460	557,2844
Fr2'	482,2130	482,2160
Fr3	486,2088	486,2482
Fr3'	411,1766	411,1794
Fr4	357,1663	357,2053
Fr4'	No detectado	No detectado

(*) En negro se representan los fragmentos que presentan la diferencia de 0,03-0,05 Da en su relación m/z referente al aminoácido carboxilo terminal de la cadena peptídica, mientras que en rojo se representan los fragmentos en los que se ha igualado su relación m/z. El ICPL suma una relación m/z de 109 al fragmento.

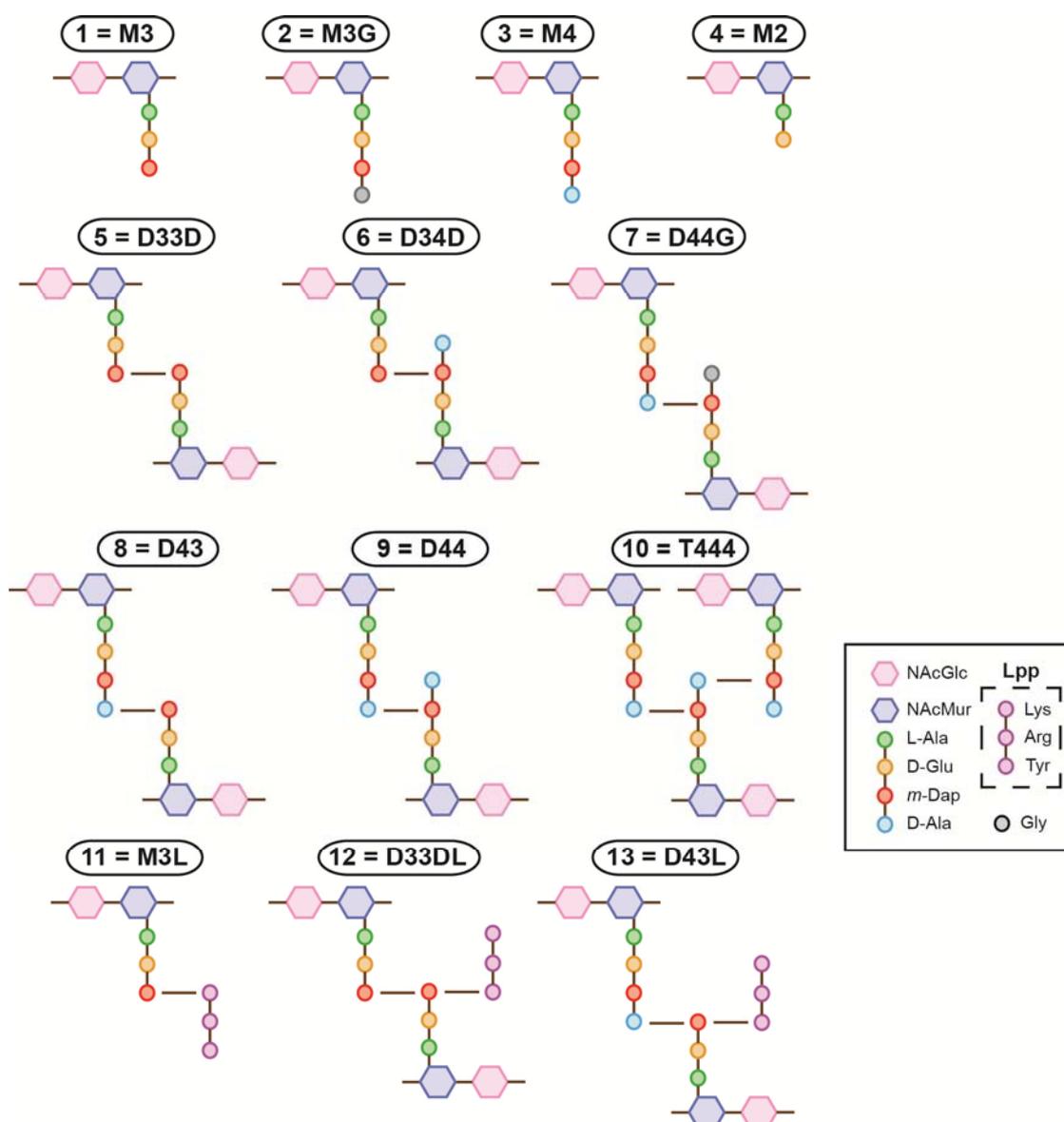


Figura 37. Estructura química de los muropéptidos identificados por HPLC en el peptidoglicano de bacteria crecida en medio LB (inóculo). Los números se corresponden con los de las figuras 38 y 39. Abreviaturas: M, monómero; D, dímero; T, trímero; L, lipoproteína de Braun (Lpp).

Figura 38. Perfil de muropéptidos del peptidoglicano de *S. Typhimurium* SV5015 en muestras obtenidas de bacteria extracelular e intracelular. **A:** cromatograma de HPLC correspondiente al peptidoglicano de bacteria crecida en DMEM durante 18 h a 37°C sin agitación. **B:** cromatograma de HPLC correspondiente al peptidoglicano de bacteria crecida en LB durante 18 h a 37°C sin agitación. **C:** cromatograma de HPLC correspondiente al peptidoglicano de bacteria intracelular obtenida tras la infección de fibroblastos BJ-5ta durante 24 h. Los números en rojo corresponden a muropéptidos ya presentes en la bacteria del inóculo y representados en la **figura 37**. Las letras en azul señalan los muropéptidos de nueva aparición en bacteria intracelular, representados en la **figura 40**.

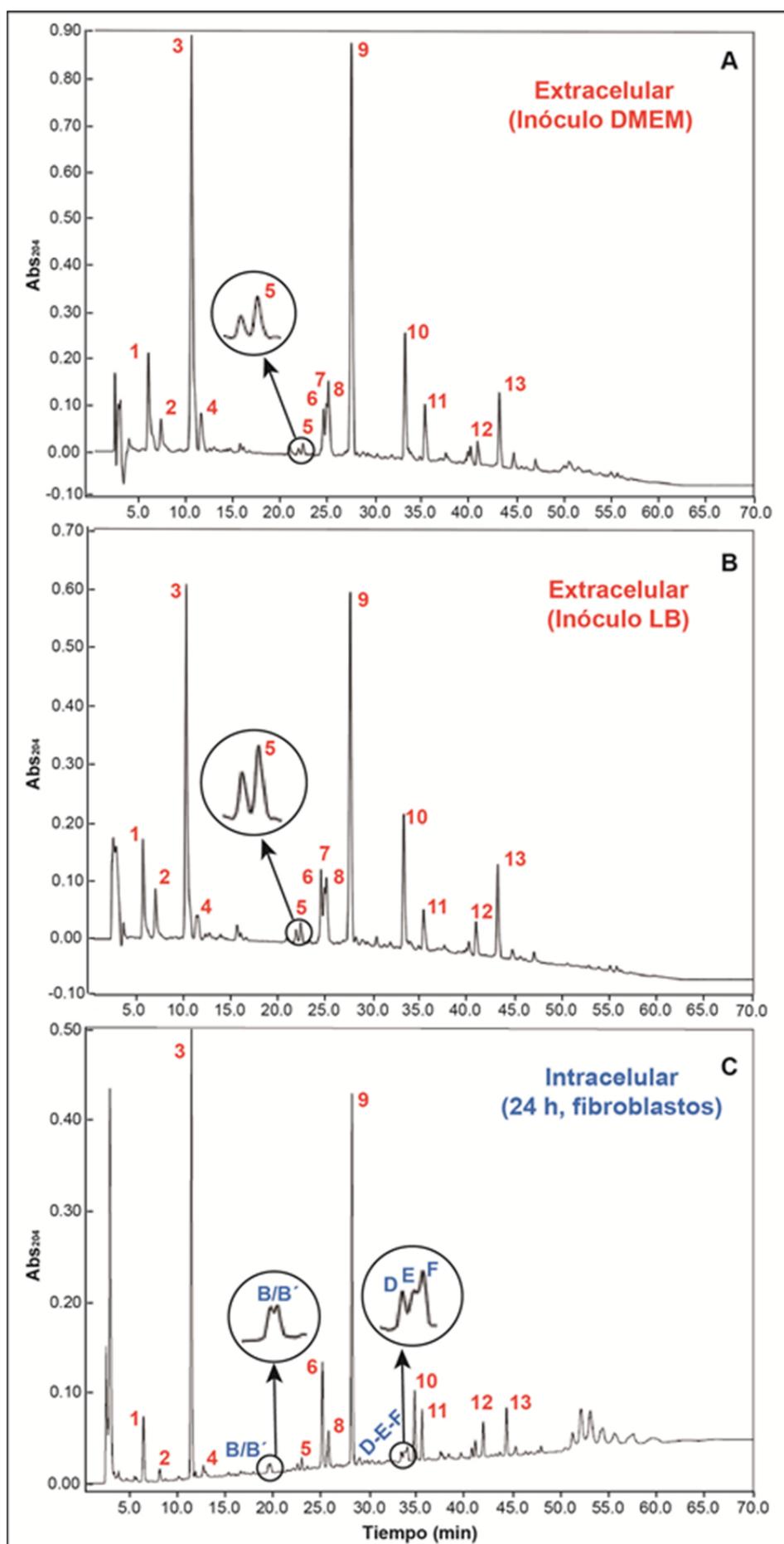
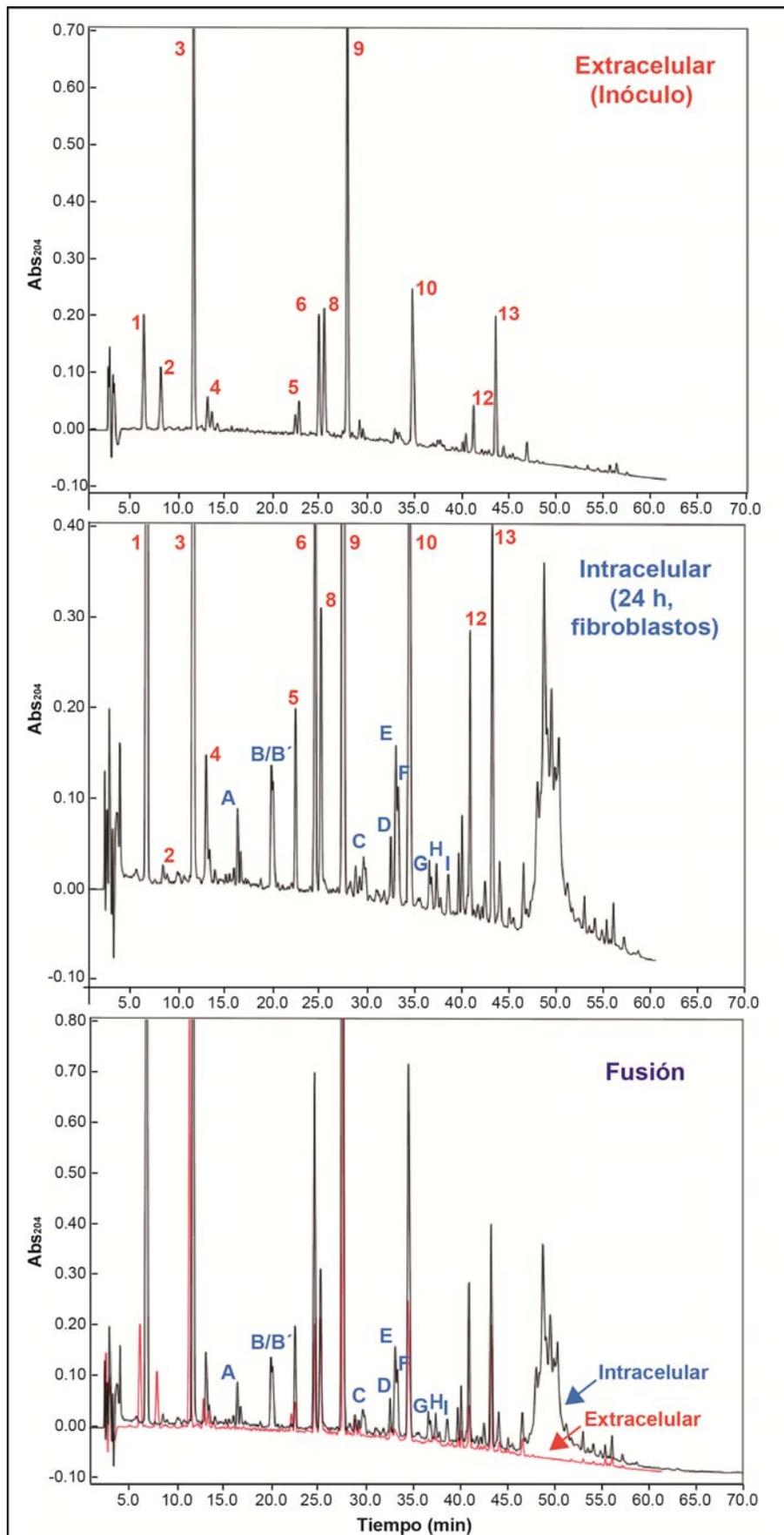


Figura 39. Perfil de muropéptidos del peptidoglicano de la estirpe *phoP7953::Tn10* en bacteria intracelular obtenida de fibroblastos BJ-5ta. A: cromatograma de HPLC correspondiente al peptidoglicano de la bacteria crecida en medio LB y empleada para la infección. **B:** cromatograma de HPLC correspondiente al peptidoglicano de la bacteria obtenida tras la infección de fibroblastos BJ-5ta durante 24 h. **C:** imagen solapante de los dos cromatogramas mostrados en los paneles **A** y **B**. Los números en rojo corresponden a muropéptidos ya presentes en la bacteria del inóculo y representados en la **figura 37**. Las letras en azul señalan los muropéptidos de nueva aparición en bacteria intracelular, representados en la **figura 40**.



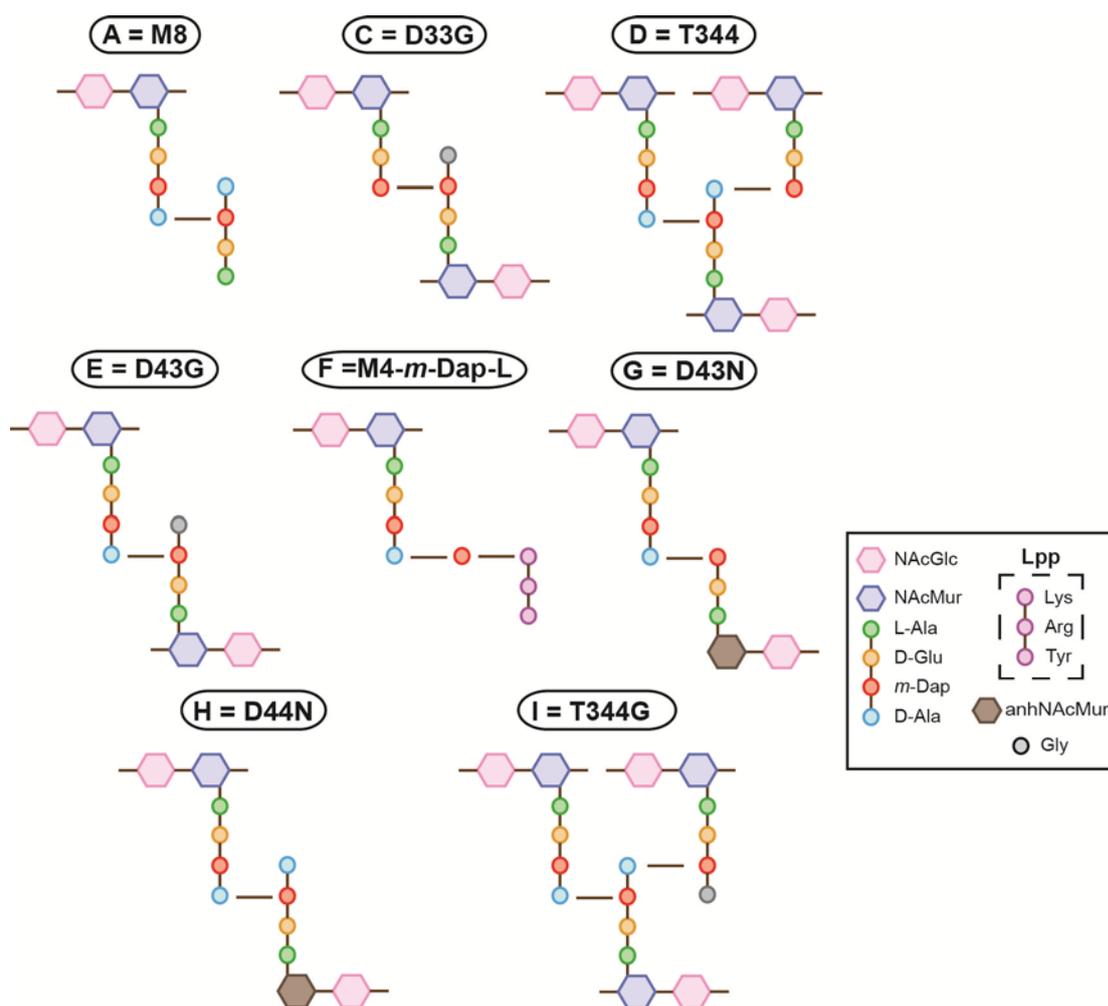


Figura 40. Estructura química de los muropéptidos identificados por HPLC en el peptidoglicano de bacteria intracelular obtenida de fibroblastos BJ-5ta. Las letras se corresponden con las de las figuras 38 y 39. Abreviaturas: M, monómero; D, dímero; T, trímero; L, lipoproteína de Braun (Lpp); N, anhNAcMur (anhidro-NAcMur).

Otro aspecto diferencial del peptidoglicano de bacteria intracelular fue el descenso notable de la cantidad relativa del muropéptido 2 (**Fig. 39**). Este muropéptido corresponde al monómero tripeptídico con una glicina (Gly) en la cuarta posición de la cadena peptídica (M3G). Curiosamente, la masa molecular determinada para B/B' por espectrometría de masas (masa = 928,4278 Da) es muy similar a la de M3G (masa = 928,3904 Da). Este hecho nos hizo plantear la posibilidad de que la bacteria intracelular transformara la estructura del muropéptido M3G, lo que provocaría un retardo en su tiempo de retención. Para estos análisis de espectrometría de masas establecimos una colaboración con el Dr. Alberto Paradela de la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología, CNB-CSIC.

En un posterior análisis mediante espectrometría de masas tipo ESI-QTOF (ESI-“*Electrospray Ionization*”; QTOF-“*Quadrupole-Time-Of-Flight mass spectrometer*”) acoplada a nanocromatografía líquida, se confirmó que M3G y B/B' tienen un tiempo distinto de retención, 7,82 min y 8,53 min, respectivamente (**Fig. 41**). Esta diferencia sugería que el muropéptido B/B',

de masa muy similar a M3G, podría ser un derivado del mismo con alguna modificación en la posición relativa de la glicina. Un análisis en detalle del espectro de masas mostró, sin embargo, unas relaciones masa/carga (m/z) de 464,6952 y de 464,7139 para M3G y B/B', respectivamente (**Fig. 42**). La ionización ESI favorece la formación de iones doblemente cargados ($z=2$), por lo que el valor obtenido para la relación masa/carga ha de multiplicarse por dos. De esta manera obtenemos unos valores de masa ($M+H^+$) de 929,3904 Da y 929,4278 Da para M3G y B/B', respectivamente, a los que una vez restada la masa del protón (+1), se obtienen valores de masas de 928,3904 Da para M3G y de 928,4278 Da para B/B'. Esta mínima diferencia de 0,0374 Da es significativa ya que el equipo empleado (un espectrómetro de masas tipo ESI-QTOF, modelo ABSciex 5600 Triple TOF) tiene, en condiciones idóneas de calibración, un error promedio entre 2 y 5 ppm, es decir, entre $\pm 0,002$ y $\pm 0,005$ Da de error para un compuesto de 1000 Da. Los espectros de fragmentación obtenidos en condiciones CID ("*Collision-Induced Dissociation*") de M3G y B/B' también aportaron datos que confirmaban que la pequeña diferencia en masa observada respondía a una característica estructural real que difería entre los dos muropéptidos. En los espectros de fragmentación (**Fig. 43; Figs. A4a y A4b** del anexo I) se observó que tras la pérdida de 203 Da, correspondiente a la NAcGlc, se identifican fragmentos con una relación m/z de 725,3129 Da y 725,3499 Da. Estos fragmentos corresponden a las especies moleculares NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-Gly/X (Fr1), pero es interesante resaltar que la diferencia de 0,037 Da se mantiene, lo que vuelve a indicar la diferencia estructural existente entre los dos muropéptidos. La clave de esta diferencia se obtuvo al analizar los fragmentos correspondientes a la cadena peptídica. Así, en el caso de M3G, además de 725,3129, los fragmentos con valores 448,1893, 377,1660 y 248,1242 mantienen una diferencia de aproximadamente 0,03-0,05 Da con los fragmentos correspondientes a B/B' 725,3499, 448,2325, 377,2106 y 248,1572. Todos estos fragmentos tienen en común que contienen el aminoácido situado en la posición carboxilo terminal del muropéptido, que en el caso de M3G es glicina (masa monoisotópica = 75,032028 Da). Interesantemente, la pérdida del aminoácido carboxilo terminal significa la desaparición de la pequeña diferencia de masas observada de manera sistemática entre M3G y B/B'. Así, los fragmentos 650,2956, 373,1687, 302,1331 y 173,0904 presentes en el espectro de fragmentación de M3G tienen su equivalente en los fragmentos 650,2902, 373,1688, 302,1326 y 173,0892 del espectro de fragmentación de B/B'. En las **tablas 9A y 9B** se pueden observar estas diferencias en las relaciones m/z de los productos de la fragmentación. La explicación más plausible para estos datos es que el compuesto situado en el extremo carboxilo terminal de M3G y B/B' es diferente, tratándose del aminoácido glicina en el primer caso (masa monoisotópica = 75,032028 Da) y de un compuesto desconocido con una masa ligeramente superior (masa monoisotópica $\sim 75,07$ Da) en el caso de B/B'.

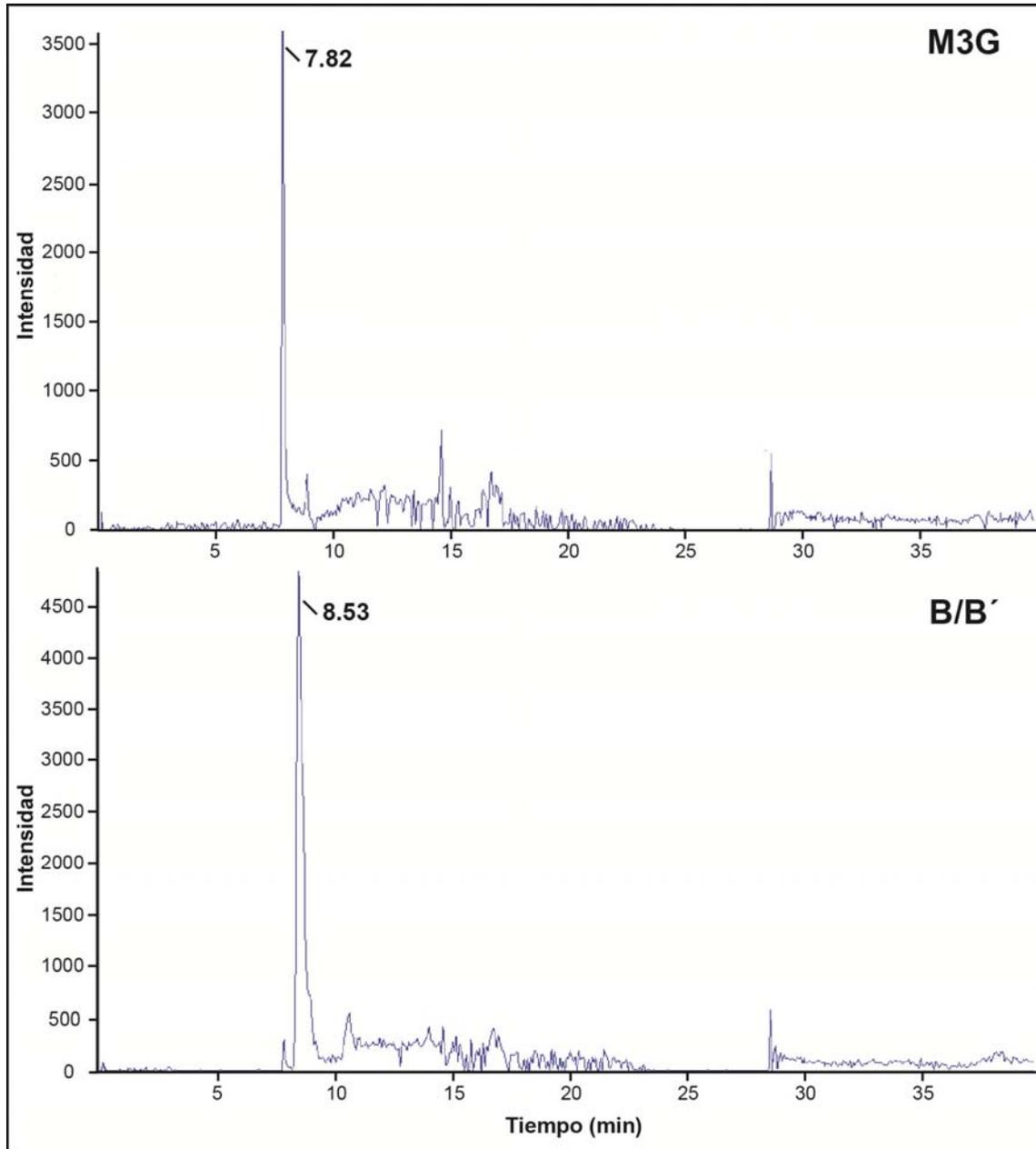


Figura 41. Tiempo de retención cromatográfico de M3G y B/B'. Se representa el tiempo de retención de cada uno de los muropéptidos tras su inyección como compuestos puros para su análisis cromatográfico por HPLC.

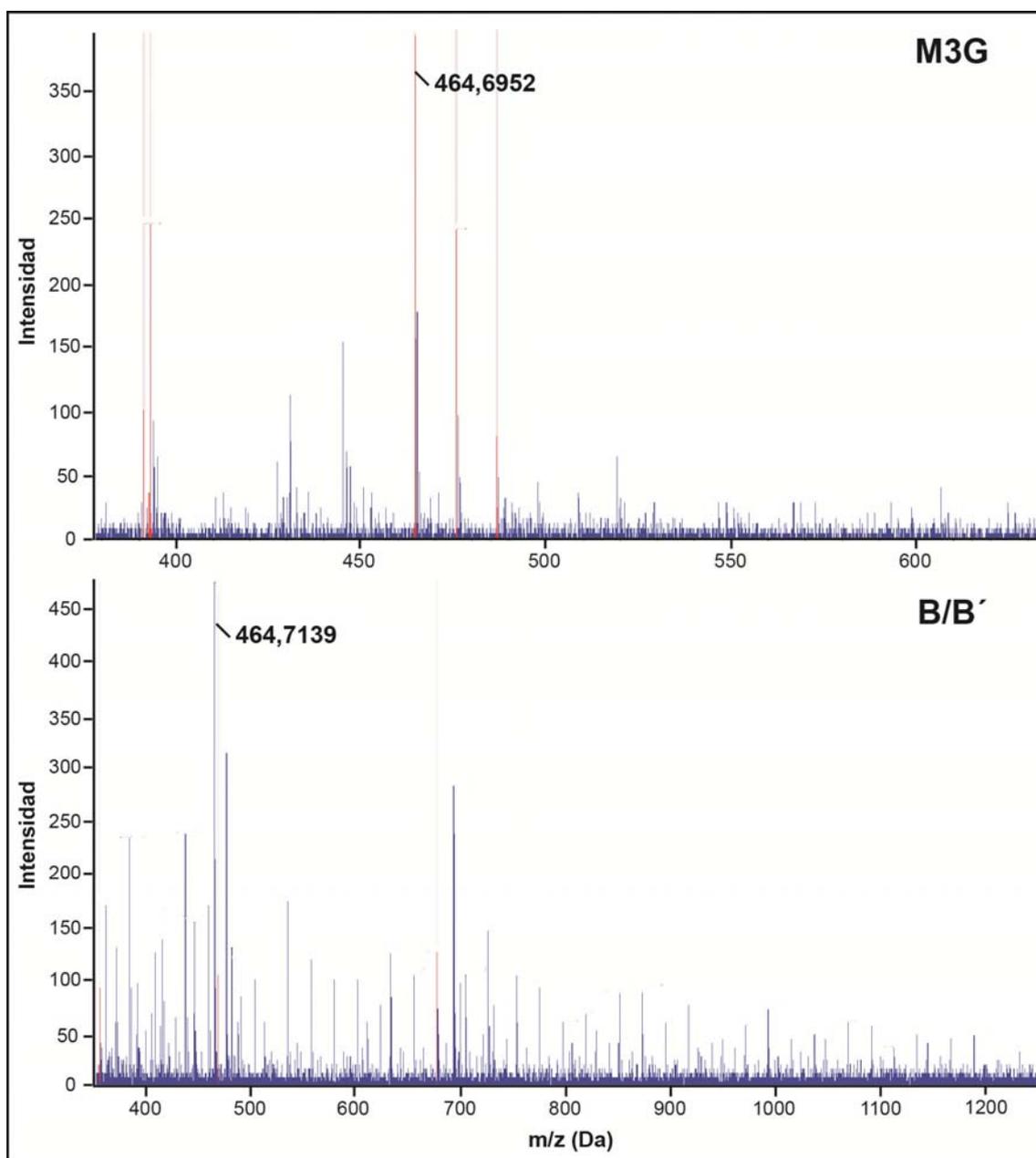


Figura 42. Espectro de masas (MS) de M3G y B/B' obtenido por ESI-QTOF. Se representa la relación masa/carga (m/z) de cada uno de los muropéptidos analizados.

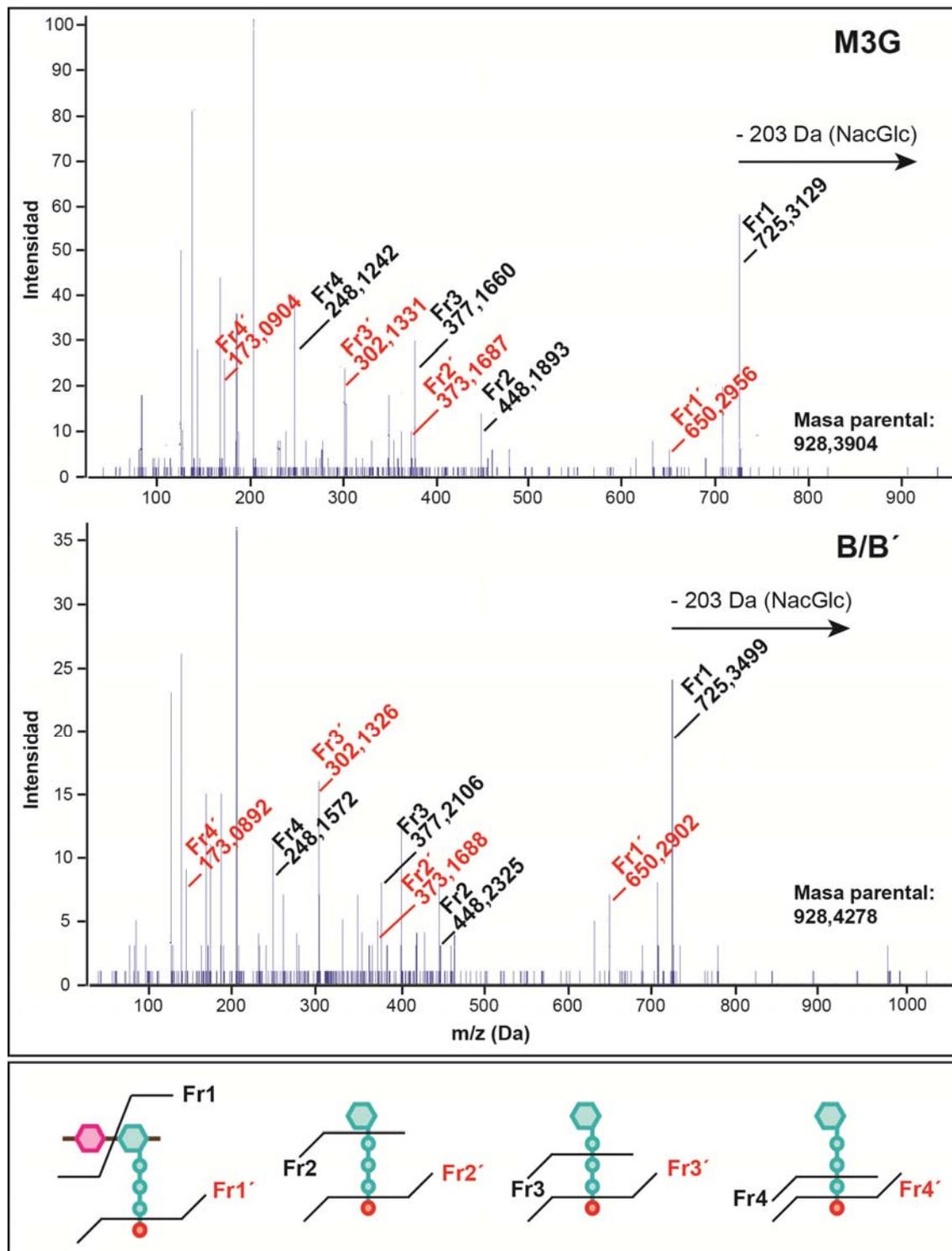


Figura 43. Espectros de fragmentación MSMS obtenidos por ESI-QTOF correspondientes a los muropeptidos M3G y B/B'. Se indican las relaciones masa/carga (m/z) de cada uno de los productos de la fragmentación de los compuestos parentales M3G y B/B'. El cuadro inferior muestra los enlaces por los que se cortan los productos de la fragmentación de los muropeptidos M3G y B/B'. Fr1: NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-Gly/X; Fr1': NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap; Fr2: L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-Gly/X; Fr2': L-Ala-D-Glu-*m*-Dap; Fr3: D-Glu-*m*-Dap-Gly/X; Fr3': D-Glu-*m*-Dap; Fr4: *m*-Dap-Gly/X; Fr4': Gly/X. Se señala en los espectros el compuesto que se genera producto de la pérdida del azúcar NAcGlc (masa = 203,077 Da).

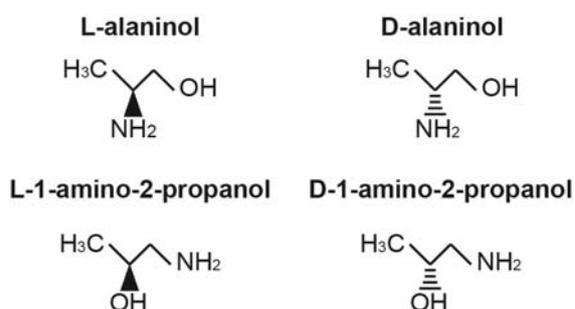


Figura 44. Posibles aminoalcoholes presentes en el muropéptido B/B' específico de bacteria intracelular. Se representan las isoformas L y D tanto del alaninol como del 1-amino-2-propanol.

En su conjunto, estos datos de fragmentación permitieron establecer para B/B' una masa molecular de 928,42 Da y de ~75,08 Da para la molécula en posición cuarta del péptido lateral. Buscamos posibles candidatos a esa molécula (tanto compuestos orgánicos como inorgánicos) en la base de datos del programa "PubChem Project" (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#>). Tras introducir una masa de 75,1 Da \pm 0,1 se identificaron, entre otros compuestos, alaninol (2-amino-1-propanol) o 1-amino-2-propanol (**Fig. 44**) como posibles candidatos a ocupar la cuarta posición en el muropéptido B/B'. La masa monoisotópica del alaninol y del 1-amino-2-propanol es 75,068414 Da, lo cual encaja perfectamente en los fenómenos descritos anteriormente. La presencia de una u otra de estas moléculas dejaría libre un único grupo amino libre en el muropéptido (**Fig. 45**), al igual que ocurría con el M3G. Para comprobar la presencia de este grupo amino, se incubaron los muropéptidos M3G y B/B' con el reactivo ICPL ("Isotope-Coded Protein Label"), compuesto que reacciona específicamente con grupos amino (NH₂) libres de las proteínas. Con este método, además de confirmarse las diferencias estructurales descritas anteriormente (**Fig. 46** y **Fig. A5** del anexo I) se determinó que el reactivo ICPL se une específicamente al grupo amino libre del *m*-Dap y por tanto, que el hipotético alaninol o 1-amino-2-propanol se une al grupo OH libre del *m*-Dap en posición tres de la cadena peptídica (**Fig. A6** del anexo I). Además, un aminoalcohol es más hidrófobo que la glicina, lo que se correspondería con el retraso en el patrón de elución de B/B' con respecto a M3G.

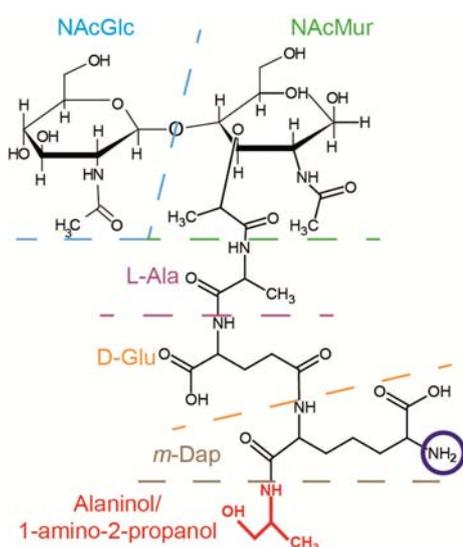


Figura 45. Posible estructura del muropéptido B/B'. Se indican los enlaces cuya rotura da lugar a productos de fragmentación identificados en el análisis de masas. Azul: NAcGlc; verde: NAcMur; morado: L-Ala; amarillo: D-Glu; gris: *m*-Dap; rojo: aminoalcohol (alaninol/ 1-amino-2-propanol). Se señala con un círculo azul el único grupo amino libre.

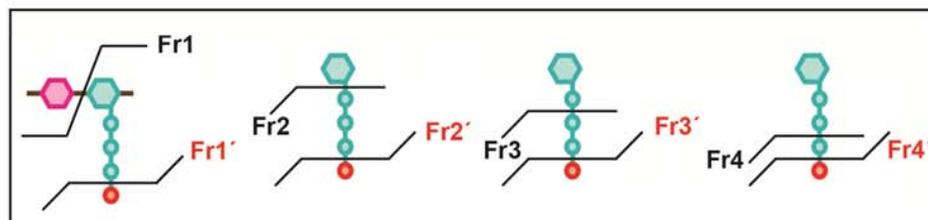
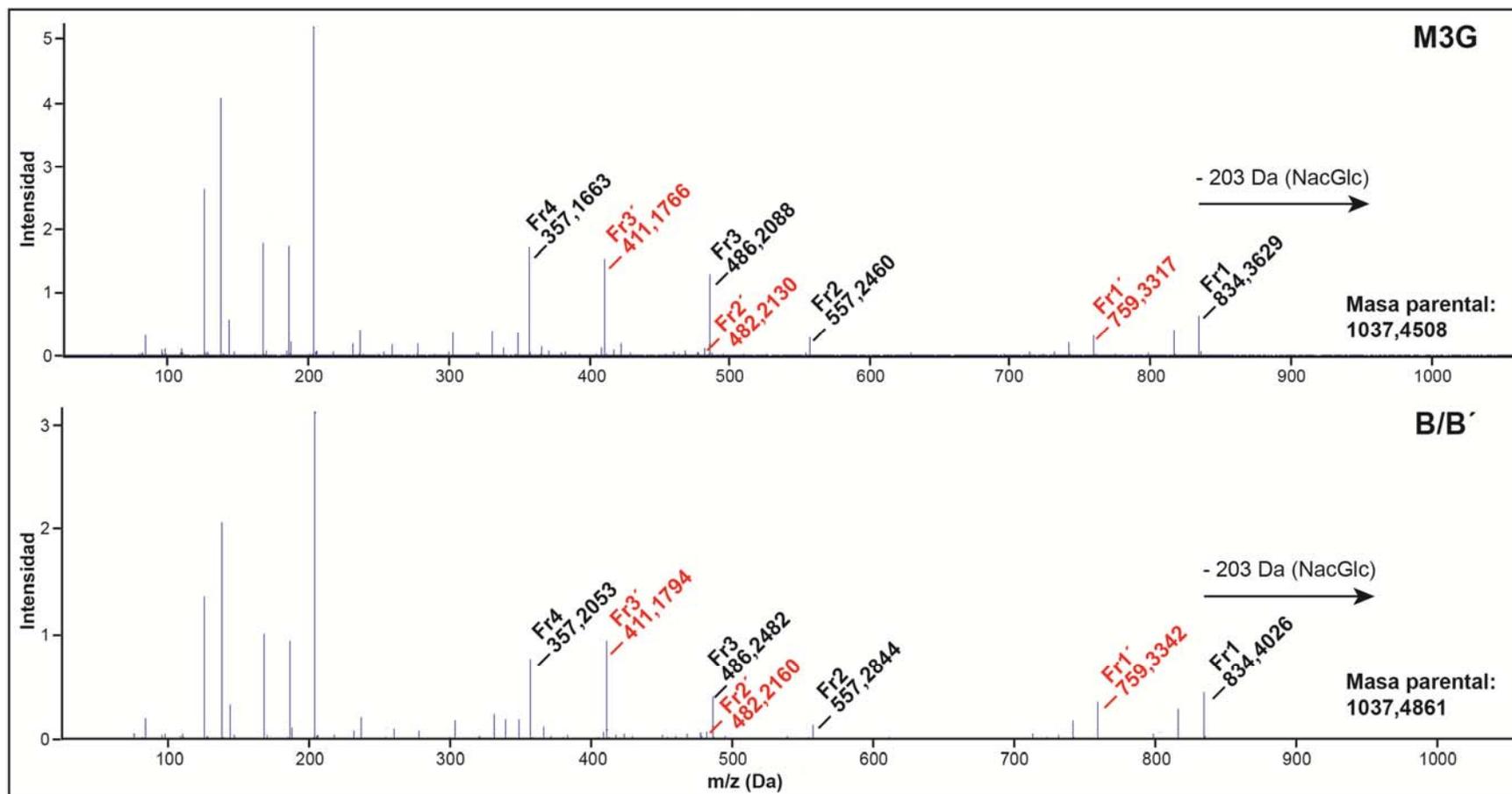


Figura 46. Espectro de fragmentación de los muropeptidos M3G y B/B' marcados con ICPL. Se muestran los valores de masa/carga (m/z) de cada uno de los productos de fragmentación derivados de los muropeptidos M3G y B/B' previamente marcados con ICPL. En el cuadro inferior se representan los enlaces por los que se cortan los productos de la fragmentación de los muropeptidos M3G y B/B'. Fr1: NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-(ICPL)-Gly/X; Fr1': NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-(ICPL); Fr2: L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-(ICPL)-Gly/X; Fr2': L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-(ICPL); Fr3: D-Glu-*m*-Dap-(ICPL)-Gly/X; Fr3': D-Glu-*m*-Dap-(ICPL); Fr4: *m*-Dap-(ICPL)-Gly/X.

Para diferenciar entre la posible presencia de alaninol y 1-amino-2-propanol en el muropéptido B/B' se hace necesario un análisis de estructura mediante resonancia magnética nuclear (RMN). Esta técnica requiere, sin embargo, una gran cantidad de muestra (del orden de microgramos), que nos era prácticamente inviable obtener de bacteria intracelular en un tiempo razonable. Realizamos por tanto, ensayos *in vitro* para comprobar si los compuestos candidatos a formar parte del muropéptido B/B', alaninol o 1-amino-2-propanol, podrían ser incorporados al peptidoglicano si eran añadidos al medio de laboratorio. De esta forma, intentábamos reproducir extracelularmente un fenómeno que el patógeno realiza dentro del fibroblasto. Se añadió al medio PCN pH 5,8 tanto D o L-alaninol como D o L-1-amino-2-propanol, todos ellos al 0,3 % (v/v). Cuando utilizábamos medio LB, estos compuestos se añadían al 0,15 % (v/v). Pruebas preliminares mostraron que estas concentraciones eran las máximas a las cuales no se comprometía la viabilidad celular o velocidad de crecimiento. Estos experimentos mostraron un resultado negativo, al no observarse muropéptido B/B' en el peptidoglicano aislado de bacteria incubada en presencia de estos compuestos. Estos resultados podían ser interpretados de dos formas no excluyentes. Bien la bacteria no incorpora estos compuestos porque en el medio de laboratorio no produce la(s) hipotética(s) enzima(s) que transforman, mediante una reacción de reducción, la glicina en posición cuatro en un alaninol o en un 1-amino-2-propanol. Y una segunda posibilidad es que el alaninol o el 1-amino-2-propanol fueran incorporados en posición cuatro como resultado de una reacción de transpeptidación, implicando un "intercambio" del aminoácido presente en posición cuatro. Esta última posibilidad se ensayó para una determinada LD-transpeptidasa, LdtA, mediante una colaboración con el grupo del Dr. Felipe Cava, Profesor del Departamento de Biología Molecular en la Universidad de Umeå, Suecia. Los ensayos realizados por Alena Aliashkevich, perteneciente a este grupo, mostraron que LdtA no incorpora D/L-alaninol o D/L-1-amino-2-propanol por D-Ala en el peptidoglicano (**Fig. 47**). Como control positivo se empleó D-metionina (D-Met), que sí fue incorporada por LdtA al peptidoglicano. En presencia de D-Met (**Fig. 48D**), la D-Met actúa como sustrato preferente de LdtA por lo que es incorporada al peptidoglicano. Como resultado se obtienen los muropéptidos M4_M y D44_M a la vez que se reducen los niveles de M4, indicativo de la reacción de intercambio (**Fig. 48**).

En resumen, tras el análisis del contenido de muropéptidos que forman el peptidoglicano de *S. Typhimurium* cuando el patógeno persiste en el interior de fibroblastos, concluimos que se producen variaciones en la cantidad relativa de algunos de ellos, apareciendo además otros muropéptidos nuevos, para los que no existe descripción en la bibliografía. Uno de estos muropéptidos (B/B') tiene en cuarta posición del péptido lateral una molécula cuya masa molecular podría tratarse de un aminoalcohol, bien alaninol o bien 1-amino-2-propanol.

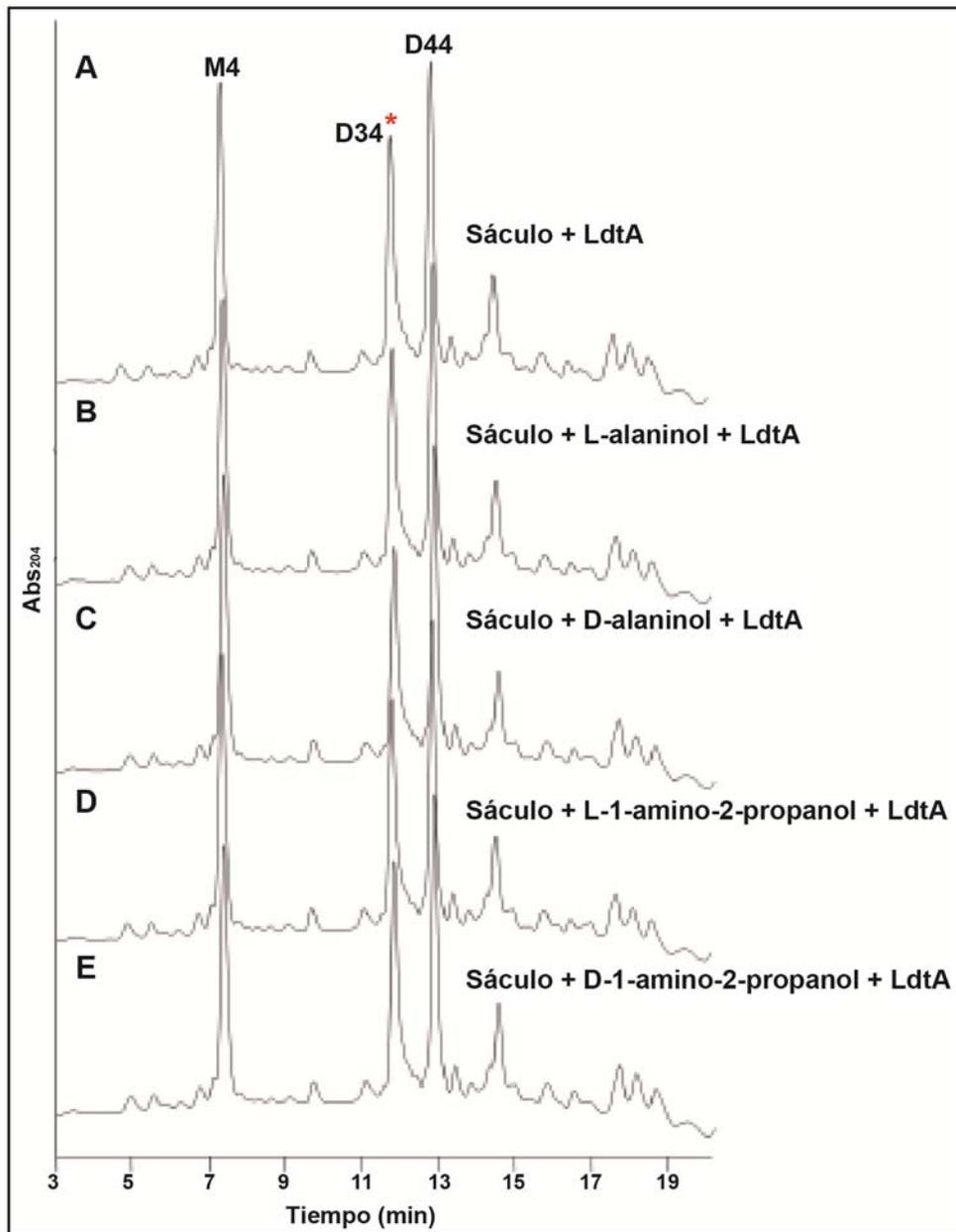


Figura 47. Ausencia de incorporación de D/L-alaninol/1-amino-2-propanol en el sáculo de *Vibrio cholerae* incubado en presencia de LdtA. Se representan los cromatogramas de HPLC correspondientes a distintas pruebas para comprobar si la enzima LdtA es capaz de incorporar D/L-alaninol/1-amino-2-propanol al sáculo de *V. cholerae*. **A:** HPLC de sáculo de *V. cholerae* incubado con LdtA. **B:** HPLC de sáculo de *V. cholerae* incubado con L-alaninol y LdtA. **C:** HPLC de sáculo de *V. cholerae* incubado con D-alaninol y LdtA. **D:** HPLC de sáculo de *V. cholerae* incubado con L-1-amino-2-propanol y LdtA. **E:** HPLC de sáculo de *V. cholerae* incubado con D-1-amino-2-propanol y LdtA. M4: NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-D-Ala; D34: NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-D-Ala-*m*-Dap-D-Glu-L-Ala-NAcMur-NAcGlc; D44: NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-D-Ala-*m*-Dap-(D-Ala)-D-Glu-L-Ala-NAcMur-NAcGlc; LdtA: LD-transpeptidasa A.

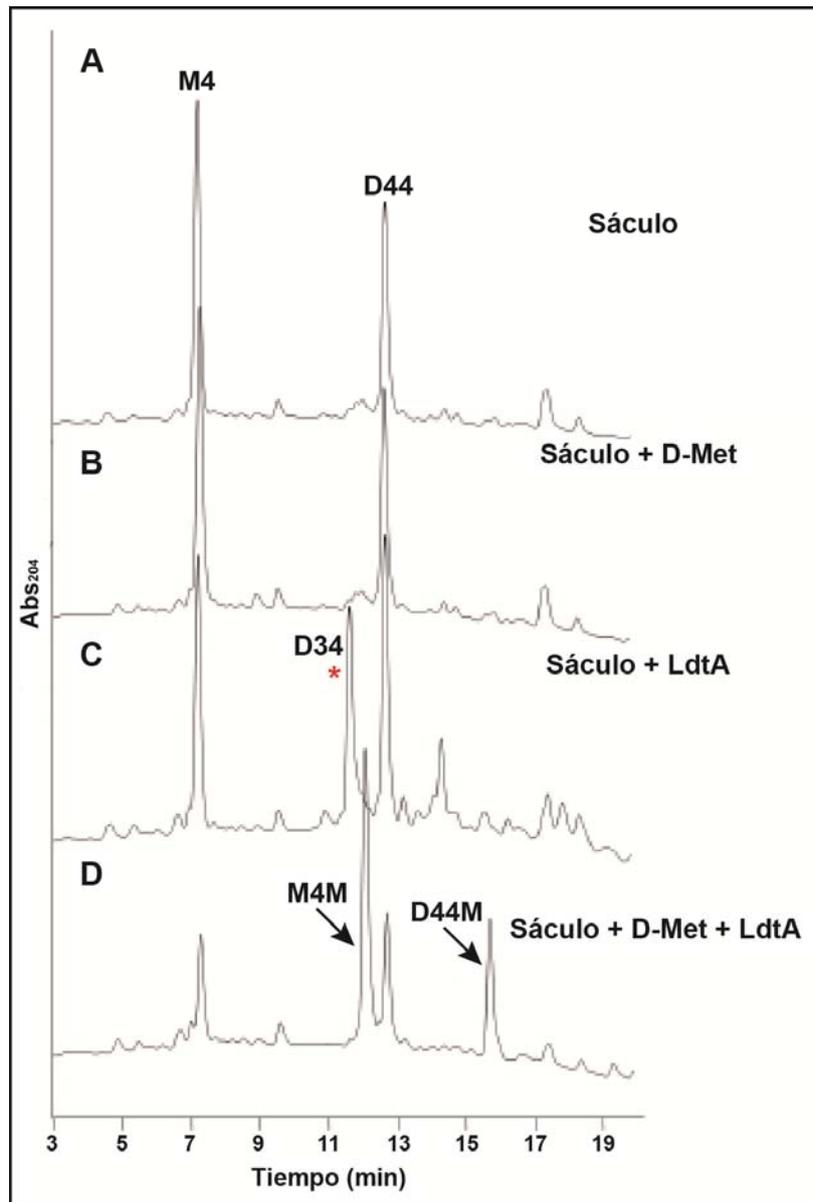


Figura 48. Incorporación de D-Met en el sáculo de *Vibrio cholerae* por la actividad de LdtA. Se representan los cromatogramas de HPLC correspondientes a las pruebas para comprobar si la enzima LdtA es capaz de incorporar D-Met en el sáculo de *V. cholerae*. **A:** HPLC de sáculo de *V. cholerae* sin D-Met ni LdtA. **B:** HPLC de sáculo de *V. cholerae* incubado con D-Met. **C:** HPLC de sáculo de *V. cholerae* incubado con LdtA. **D:** HPLC de sáculo de *V. cholerae* incubado con D-Met y LdtA. M4: NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-D-Ala; D44: NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-D-Ala-*m*-Dap-(D-Ala)-D-Glu-L-Ala-NAcMur-NAcGlc; D34: NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-D-Ala-*m*-Dap-D-Glu-L-Ala-NAcMur-NAcGlc; M4_M: NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-D-Ala-D-Met; D44_M: NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-D-Ala-*m*-Dap-(D-Ala-D-Met)-D-Glu-L-Ala-NAcMur-NAcGlc; D-Met: D-metionina; LdtA: LD-transpeptidasa A.

CAPÍTULO 5

Estudio funcional de la enzima del peptidoglicano STM1940, inducida por *S. enterica* serovar Typhimurium en el interior de células eucariotas

La proteína codificada por el gen *STM1940* atrajo nuestro interés al estar codificada en una isla genómica ausente en *E. coli*. *STM1940* está anotada en bases de datos como “hidrolasa asociada a pared celular” y los datos de transcriptómica obtenidos en nuestro laboratorio muestran que la expresión de *STM1940* aumenta en bacteria intracelular que persiste en el interior de fibroblastos (Núñez-Hernández *et al.*, 2013). *STM1940* comparte además el dominio NlpC_P60 (Pfam no. PF00877) con YdhO, Spr y NlpC, proteínas con una actividad DD-EPasa, LD-CPasa y DL-CPasa, respectivamente (Singh *et al.*, 2012). Tras realizar una búsqueda de posibles homologías en otras especies bacterianas mediante BLASTp se detectaron veintidós proteínas similares, todas ellas con el dominio NlpC_P60 (Anantharaman & Aravind, 2003).

5.1 *STM1940* mapea en una isla genómica de *S. Typhimurium* que está ausente en *E. coli*

La búsqueda de homólogos de *STM1940* en los géneros *Salmonella* y *Escherichia* mediante BLASTp puso de manifiesto que *STM1940* está en todas las especies y serovares del género *Salmonella* pero está ausente en la mayoría de estirpes de *E. coli* con genoma secuenciado. Las dos únicas excepciones fueron *Escherichia* sp. TW09276, un aislado ambiental (Luo *et al.*, 2011), y *Escherichia* sp. KTE52, un aislado humano. En *S. Typhimurium*, el gen *STM1940* está flanqueado por *STM1939* y *STM1941*, dos genes ausentes en todos los genomas de *E. coli* depositados hasta la fecha en las bases de datos (Fig. 49). El gen *STM1939* está anotado como posible glucosa-6-fosfato deshidrogenasa mientras que *STM1941* codifica una proteína, probablemente de membrana, de función desconocida. En el genoma de *S. Typhimurium* SL1344, los genes *STM1939* y *STM1941* están flanqueados por *yecA*, un gen de función desconocida, y un pseudogen (*STM1941A*), éste último seguido de *leuZ*, *cysT* y *glyW*, tres genes que codifican tRNAs (Fig. 50). Tanto *yecA* como *leuZ*, *cysT* y *glyW* están conservados en *S. enterica* y *E. coli*. Las búsquedas mediante BLASTn confirmaron que el agrupamiento génico *yecA-STM1939-STM1940-STM1941-STM1941A-leuZ-cysT-glyW* está presente exclusivamente en el género *Salmonella*. Basándonos en estas observaciones, concluimos que los genes *STM1939-STM1940-STM1941-STM1941A* constituyen una nueva isla genómica de *S. Typhimurium* no descrita con anterioridad y ausente en *E. coli*. La adquisición de esta isla por mecanismos de transferencia génica horizontal viene apoyado por su bajo contenido en G+C (42,8 %, 48,5 %, 36,9 % y 47,7 %, para *STM1939-STM1940-STM1941-STM1941A*, respectivamente), sustancialmente más bajos que la media del 52 % del genoma de *Salmonella*. Además, el contenido más bajo en G+C del gen *STM1941* (36,9 %) sugiere que éste se pudo haber incorporado en el genoma de *Salmonella* independientemente del resto de la isla. La idea de una evolución modular de esta isla es consistente con la configuración de esta región en el genoma de la especie no patógena *S. bongori*, en la que no se observan secuencias completamente homólogas a *STM1941* y al pseudogen *STM1941A* (Fig. 50).

El análisis mediante BLASTp fuera de los géneros *Salmonella* y *Escherichia* mostró posibles ortólogos de *STM1939*, *STM1940* y *STM1941* en algunas especies bacterianas, con identidades en el rango de entre un 30-63 % y un 80-100 % de cobertura de la secuencia. Curiosamente, mediante el análisis filogenético observamos que ninguna de estas tres proteínas parece tener una evolución paralela (Fig. A8). Esta observación refuerza la idea de que esta isla genómica en la que está *STM1940* pudo incorporarse en *Salmonella* de forma modular en varios procesos independientes. En su conjunto, estos análisis *in silico* revelaron que *STM1940*, un gen

que codifica una “posible hidrolasa de pared celular”, mapea en una nueva isla genómica de *Salmonella*.

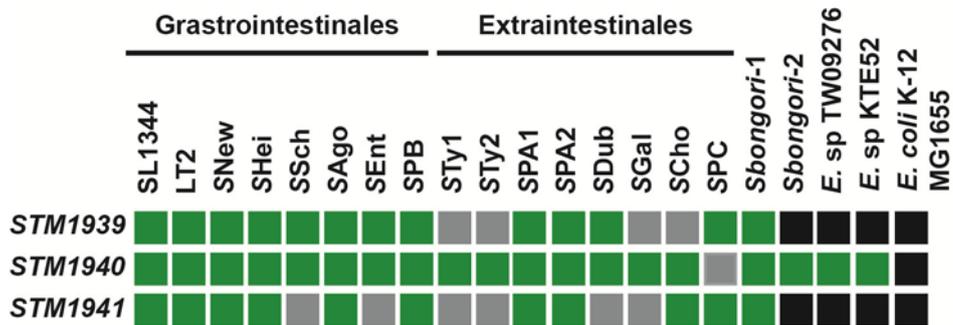


Figura 49. Distribución de los genes *STM1939*, *STM1940* y *STM1941* en distintas especies y serovares del género *Salmonella* y en *E. coli* K-12 MG1655. Se analizó mediante BLASTn la presencia de ortólogos de estos tres genes en las siguientes especies, serovares y estirpes: *S. Typhimurium* SL1344 (SL1344), *S. Typhimurium* LT2 (LT2), *S. Newport* SL254 (SNew), *S. Heidelberg* SL476 (SHei), *S. Schwarzengrund* CVM19633 (SSch), *S. Agona* SL483 (SAGO), *S. Enteritidis* P125109 (SEnt), *S. Paratyphi B* SP87 (SPB), *S. Typhi* CT18 (STy1), *S. Typhi* Ty2 (STy2), *S. Paratyphi A* ATCC9150 (SPA1), *S. Paratyphi A* AKU_12601 (SPA2), *S. Dublin* CT_02021853 (SDub), *S. Gallinarum* 287/91 (SGal), *S. Choleraesuis* SC-B67 (SCho), *S. Paratyphi C* RKS4594 (SPC), *S. bongori-1* N268-08 (Sbongori-1) y *S. bongori-2* NCTC12419 (Sbongori-2). Como referencia, también se hizo el análisis en *E. coli* K-12 MG1655 y en dos especies de *Escherichia* donde se encuentra el gen *STM1940*: *Escherichia* sp TW09276 (*E. sp* TW09276) y *Escherichia* sp. KTE52 (*E. sp* KTE52). Verde: hay homólogos identificados; gris: pseudogenes; negro: no hay homólogos identificados.

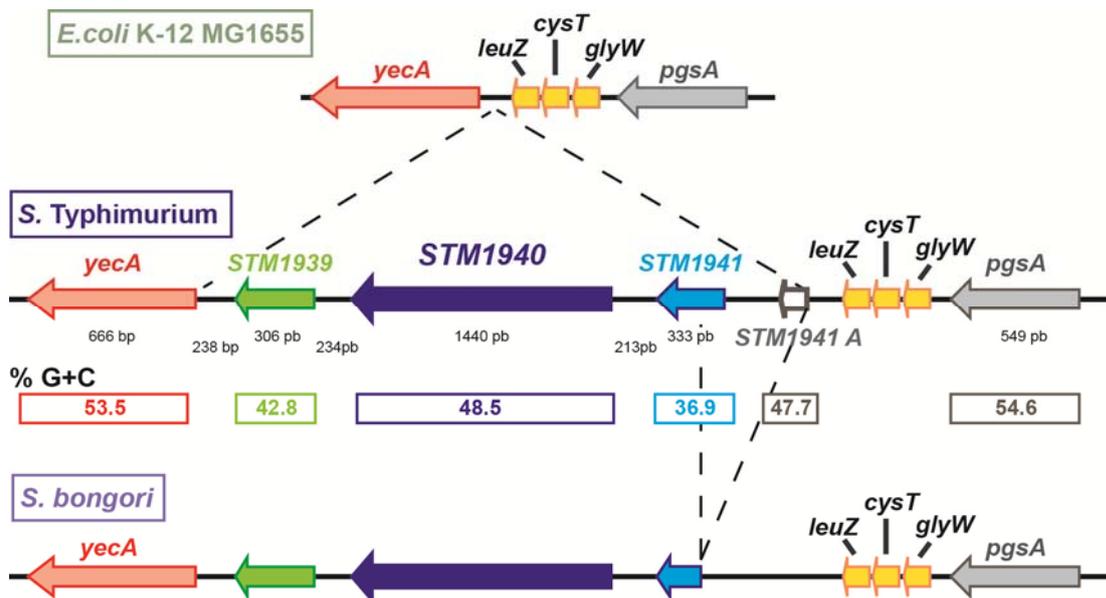


Figura 50. *STM1940* mapea en una isla genómica de *Salmonella* que está ausente en la mayoría de estirpes de *E. coli*. Esquema de la región genómica de *Salmonella* que contiene el gen *STM1940*. Este gen está conservado en todos los serotipos de *S. enterica* y ausente en la mayoría de estirpes de *E. coli*. Los genes flanqueantes *STM1939* y *STM1941* muestran la misma distribución filogenética que *STM1940*. Se representan las regiones genómicas de *E. coli* K-12 MG1655, *S. enterica* serovar Typhimurium SL1344 y *S. bongori* N268-08. Nótese que el genoma de *S. bongori* carece de un fragmento de la isla genómica corriente arriba de *STM1940*. Esta región incluye parte de *STM1941* y del pseudogen *STM1941A*. El contenido G+C de cada uno de los genes mostrados se indica en recuadros con el color correspondiente a cada gen para el caso del genoma de *S. Typhimurium* SL1344. *leuZ*, *cysT* y *glyW* codifican tRNAs.

5.2 Regulación en la producción de la proteína STM1940

Teniendo en cuenta las características únicas del gen *STM1940* como codificante de una posible enzima del metabolismo del peptidoglicano y que mapea en una isla genómica, procedimos a analizar si su producto está sometido a regulación. La expresión de la proteína STM1940 se estudió tanto en bacteria extracelular como en bacteria intracelular obtenida tras la infección de fibroblastos y de células epiteliales HeLa, empleando una estirpe que porta un alelo *STM1940::3xFLAG-kan* etiquetado en el extremo 3' en su localización cromosómica nativa. Las bacterias se incubaron en el medio rico en nutriente LB y en los medios mínimos PCN pH 5,8, PCN pH 7,4 e ISM hasta fases de crecimiento estacionaria (18 h a 37°C) y exponencial ($DO_{600} \sim 0,2$). Los ensayos de Western mostraron que la bacteria produce STM1940 en LB en fase estacionaria (**Fig. 51A**). STM1940 también se detecta a niveles altos en PCN pH 5,8 tanto en fase exponencial como estacionaria y en PCN pH 7,4 en fase estacionaria. En el medio ISM, STM1940 se detectó en ambas fases de crecimiento (**Fig. 51A**). Estos datos indicaban que la producción de STM1940 pudiera estar favorecida cuando la bacteria cesa su crecimiento y en condiciones en las que existe una limitación de nutrientes que asemejan el ambiente intracelular de células eucariotas, caso de los medios mínimos PCN pH 5,8 e ISM (Deiwick *et al.*, 1999; Headley & Payne, 1990).

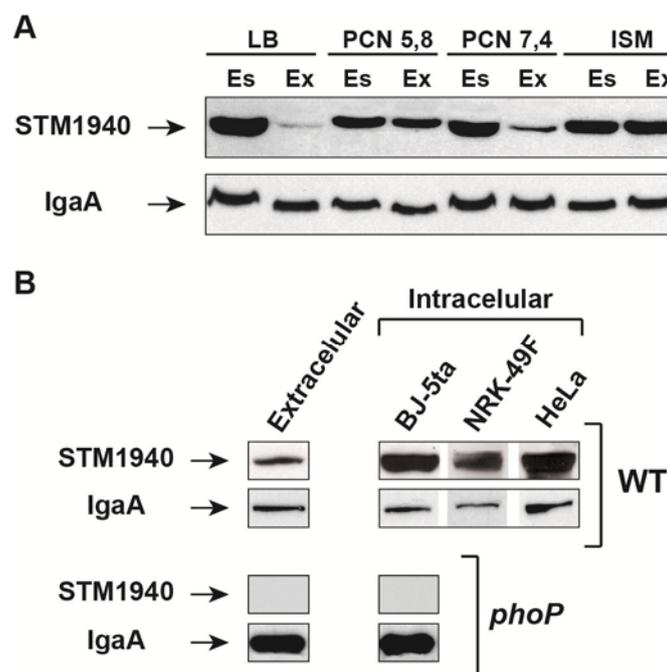


Figura 51. Producción de STM1940 por *S. Typhimurium* en distintos medios de cultivo y en el interior de células eucariotas. **A:** niveles de STM1940 detectados mediante Western en extractos de proteína total de la estirpe *STM1940::3xFLAG-kan* crecida en los medios LB, PCN pH 5,8, PCN pH 7,4 e ISM. Es: fase estacionaria; Ex: fase exponencial. **B:** producción de STM1940 en bacteria intracelular obtenida tras infectar fibroblastos (BJ-5ta, NRK-49F) y células epiteliales (HeLa). La expresión de STM1940 es nula en el mutante *phoP* que sobrecrece en el interior de fibroblastos (BJ-5ta). Se empleó la proteína IgaA como control de carga. Datos representativos de un mínimo de tres repeticiones biológicas independientes.

Considerando este peculiar perfil de expresión, analizamos si STM1940 podría ser una proteína cuya producción estaría favorecida en bacteria que se encuentra en estado de no crecimiento en el interior de fibroblastos (Cano *et al.*, 2001). Los ensayos de Western mostraron niveles más altos de STM1940 en bacteria intracelular aislada de fibroblastos humanos BJ-5ta y de rata NRK-49F con respecto a la bacteria del inóculo empleada para infectar (Fig. 51B). Este aumento de expresión de STM1940 en el ambiente intracelular también se produjo en células epiteliales HeLa, en las que la bacteria prolifera (Fig. 51B). En conclusión, estos datos indicaban que *S. Typhimurium* aumenta significativamente la producción de STM1940 en el ambiente intracelular de células eucariotas. Este patrón de expresión podría explicar la abundancia de STM1940 en bacteria que ha cesado su crecimiento o responde a algún estrés, como por ejemplo, una cantidad de nutrientes limitada.

5.3 La producción de STM1940 está controlada por los sistemas de dos componentes PhoP-PhoQ y OmpR-EnvZ, además de por el regulador SlyA

La presencia de STM1940 junto con STM1939 y STM1941 en una isla genómica y su ausencia en *E. coli* nos llevó a plantear su posible contribución en virulencia. Muchos genes de *S. Typhimurium* que son necesarios para virulencia y que no están presentes en *E. coli*, y por lo tanto fueron adquiridos por transferencia horizontal, están bajo el control de reguladores transcripcionales como PhoP, OmpR o SlyA (Fass & Groisman, 2009; Groisman, 2001). PhoP forma parte del sistema de dos componentes PhoP-PhoQ que responde a señales como la carencia de magnesio, pH ácido y presencia de péptidos catiónicos (Núñez-Hernández *et al.*, 2013; Lejona *et al.*, 2003). El pH ácido también activa OmpR, que forma parte de un sistema de dos componentes denominado OmpR-EnvZ (Quinn *et al.*, 2014). SlyA es un factor transcripcional que comparte muchos genes diana con PhoP-PhoQ. SlyA es, además, necesario para la supervivencia de *S. Typhimurium* en macrófagos, así como para resistir al estrés oxidativo y a péptidos catiónicos antimicrobianos (Haneda *et al.*, 2011).

En ensayos de Western realizados sobre muestras de un mutante *phoP*, observamos que la expresión de STM1940 es nula en bacteria aislada de fibroblastos humanos BJ-5ta (Fig. 51B). Los estudios realizados en los medios LB, PCN pH 5,8 e ISM demostraron que el mutante *phoP* tampoco produce STM1940 en el ambiente extracelular (Fig. 52A). Esta fuerte regulación positiva por PhoP se confirmó al observar que la producción de STM1940 se anulaba en bacteria silvestre incubada en 10 mM Mg²⁺ (Fig. 52B), una condición que reprime el sistema PhoP-PhoQ (Soncini *et al.*, 1996). En conclusión, estos datos demostraban que el sistema PhoP-PhoQ regula positivamente la expresión de STM1940 en los ambientes extracelular e intracelular. Además, observamos un efecto similar al etiquetar STM1939 y STM1941 donde la producción de estas proteínas es fuertemente dependiente de PhoP (Fig. 52A). Posteriormente, analizamos si STM1940 o alguna de las proteínas de su isla genómica (STM1939 y STM1941) eran reguladas por OmpR y/o SlyA. En el medio PCN pH 5,8 en fase exponencial se observaron niveles más bajos de las proteínas en el mutante *ompR* con respecto a la estirpe silvestre (Fig. 52A). Por otro lado, en el caso de SlyA, se detectaron diferencias entre las proteínas STM1939 y STM1941 que se expresan menos en el mutante *slyA* mientras que, STM1940 se expresa más, principalmente en ISM exponencial (Fig. 52A). En su conjunto, estos datos apuntan a una regulación completa en esta isla, en la que PhoP actuaría como regulador positivo principal sobre los tres genes que la

componen, mientras que OmpR y SlyA podrían modular bien positivamente o negativamente dependiendo del gen.

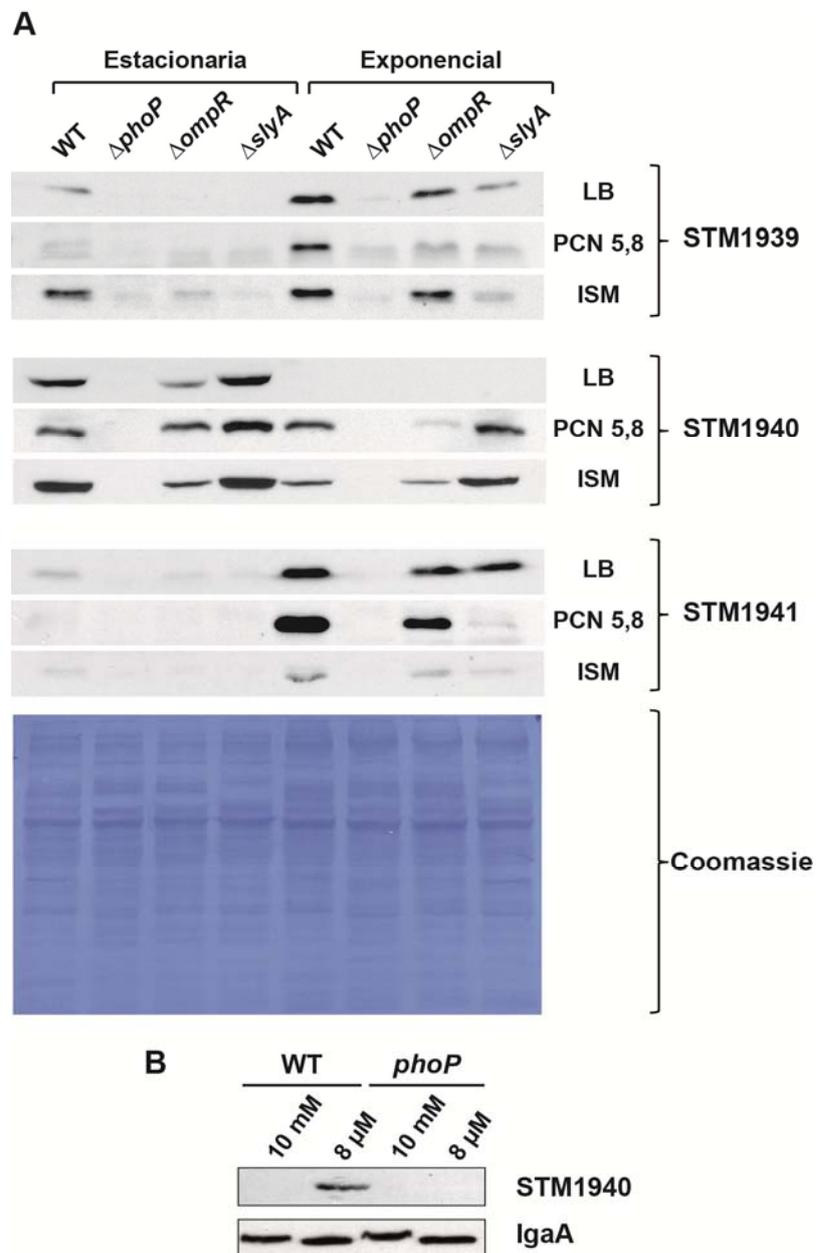


Figura 52. Efecto de las mutaciones *phoP*, *ompR* y *slyA* y de una alta concentración de Mg^{2+} en la producción de STM1939, STM1940 y STM1941 por *S. Typhimurium*. **A:** niveles de STM1939, STM1940 y STM1941 detectados mediante Western en extractos de proteína total de la estirpe silvestre y los mutantes $\Delta phoP$, $\Delta ompR$ y $\Delta slyA$ portando los alelos *STM1939::3xFLAG-kan*, *STM1940::3xFLAG-kan* y *STM1941::3xFLAG-kan* crecidas en LB, PCN pH 5,8 e ISM. Se muestra la tinción con Coomassie de la membrana como control de carga de las muestras de LB. **B:** disminución de la expresión de STM1940 en la bacteria silvestre en presencia de 10 mM Mg^{2+} . Se empleó el medio mínimo N con baja (8 μ M) o alta (10 mM) concentración de $MgCl_2$. La proteína IgaA fue detectada como control de carga.

5.4 Determinación de la actividad enzimática de STM1940

5.4.1 Purificación de STM1940

Se realizó un fraccionamiento de STM1940 con el fin de analizar su localización subcelular en el que se observó que la proteína está asociada a membrana (**Fig. 53**). A continuación, decidimos purificarla para proceder a su caracterización funcional. En los ensayos iniciales, clonamos el gen *STM1940* completo, incluyendo la región que codifica el péptido señal sobre el plásmido pET-22b(+). Esta estrategia no fue exitosa, ya que la proteína se acumulaba en la fracción de membranas y formaba cuerpos de inclusión, no siendo capaces de obtener proteínas en fase soluble (**Fig. A7** del anexo I). Por este motivo, decidimos expresar una nueva versión de la proteína sin el péptido señal de modo que se evitara su asociación a membrana, aumentando la posibilidad de obtener una proporción de la proteína en fase soluble apta para su posterior purificación. A su vez, introdujimos en esta construcción una cola 6xHis en el extremo carboxilo para facilitar la purificación de la proteína mediante resina “TALON” (**Fig. 54**).

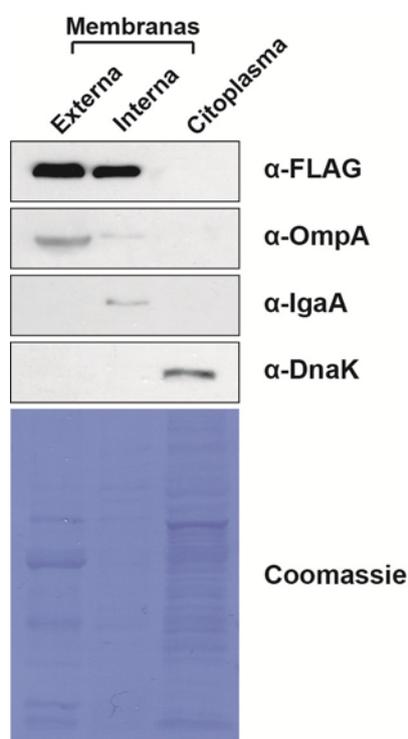


Figura 53. Localización subcelular de STM1940 en *S. Typhimurium*. Se muestra un Western realizado con anticuerpo anti-FLAG sobre fracciones subcelulares de la estirpe *STM1940::3xFLAG-kan* que incluyen: membrana externa, membrana interna y citoplasma. OmpA, IgaA y DnaK se emplearon como controles ya que muestran una localización exclusiva en cada una de estas fracciones, respectivamente. Como control de carga se muestra la tinción con Coomassie de la membrana utilizada en el Western

5.4.2 Ensayos de actividad enzimática de la proteína STM1940

Una vez purificada STM1940, y considerando una posible actividad “endopeptidasa” asociada a su dominio NlpC_P60 (Pfam no. PF00877), se realizaron ensayos por separado con distintos muropeptidos, tanto monómeros como dímeros que habían sido purificados previamente mediante HPLC. Los monómeros y dímeros que se emplearon se describen en la **tabla 10**.

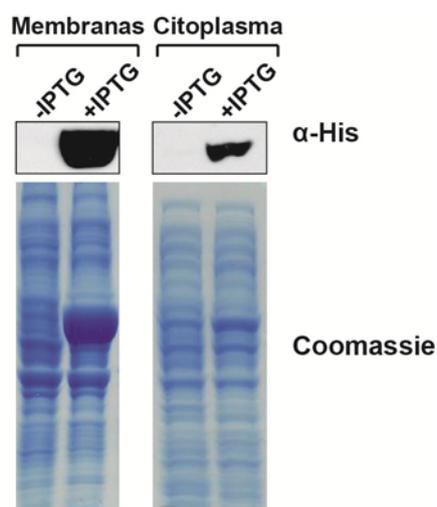


Figura 54. Producción de STM1940::6xHis sin el péptido señal. Se muestra el Western realizado con anticuerpo anti-His sobre fracciones de membrana y de citoplasma, tras la inducción o no con IPTG, de la estirpe STM1940::6xHis así como la detección de la proteína mediante tinción con Coomassie.

Tabla 10. Monómeros y dímeros empleados para el estudio de la actividad de STM1940

Muropéptido	Composición
Monómero tripéptido (M3)	NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu- <i>m</i> -Dap
Monómero tripéptido-glicina (M3G)	NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu- <i>m</i> -Dap-Gly
Monómero tetrapéptido (M4)	NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu- <i>m</i> -Dap-D-Ala
Monómero pentapéptido (M5)	NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu- <i>m</i> -Dap-D-Ala-D-Ala
Dímero tetra-tripéptido (D43)	NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu- <i>m</i> -Dap-D-Ala- <i>m</i> -Dap-D-Glu-L-Ala-NAcMur-NAcGlc
Dímero tri-tetrapéptido con enlace <i>m</i> -Dap- <i>m</i> -Dap (D34D)	NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu- <i>m</i> -Dap- <i>m</i> -Dap-(D-Ala)-D-Glu-L-Ala-NAcMur-NAcGlc
Dímero tetra-tetrapéptido (D44)	NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu- <i>m</i> -Dap-D-Ala- <i>m</i> -Dap-(D-Ala)-D-Glu-L-Ala-NAcMur-NAcGlc
Dímero tetra-tetrapéptido-glicina (D44G)	NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu- <i>m</i> -Dap-D-Ala- <i>m</i> -Dap-(D-Ala-Gly)-D-Glu-L-Ala-NAcMur-NAcGlc

En los ensayos iniciales realizados incubando durante 3 h STM1940::6xHis con cada uno de los muropéptidos, observamos que la proteína sólo presentaba actividad de tipo endopeptidasa ante los monómeros. Para analizar la especificidad de esta actividad, se realizó otro ensayo a 0 h, 1,5 h y 3 h cuyos resultados demostraron que STM1940 muestra mayor actividad sobre M3 y M3G que sobre M4 y M5. El análisis de HPLC demostró que en todos los casos el producto de la reacción era el monómero dipéptido (M2) NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu (**Fig. 55A-D**). Este resultado indicaba que STM1940 rompe el enlace entre el D-Glu en segunda posición de la cadena peptídica lateral y el *m*-Dap de la tercera posición pudiendo, por tanto, ser clasificada como DL-endopeptidasa/DL-carboxipeptidasa (**Fig. 55F**).

En los ensayos realizados sobre los dímeros se observa que la proteína no presenta actividad ya que no hay conversión de ninguno de los picos a M2 (**Fig. 55E**). También se realizaron experimentos con STM1940::6xHis sobre peptidoglicano macromolecular. Estos ensayos no mostraron, sin embargo, actividad hidrolítica que supusiera cambios en los niveles de ningún muropéptido (**Fig. A9** del anexo I). En su conjunto, estos resultados indicaban que STM1940 podría actuar sobre la cadena lateral de muropéptidos una vez liberados del peptidoglicano macromolecular, probablemente por una transglicosilasa lítica.

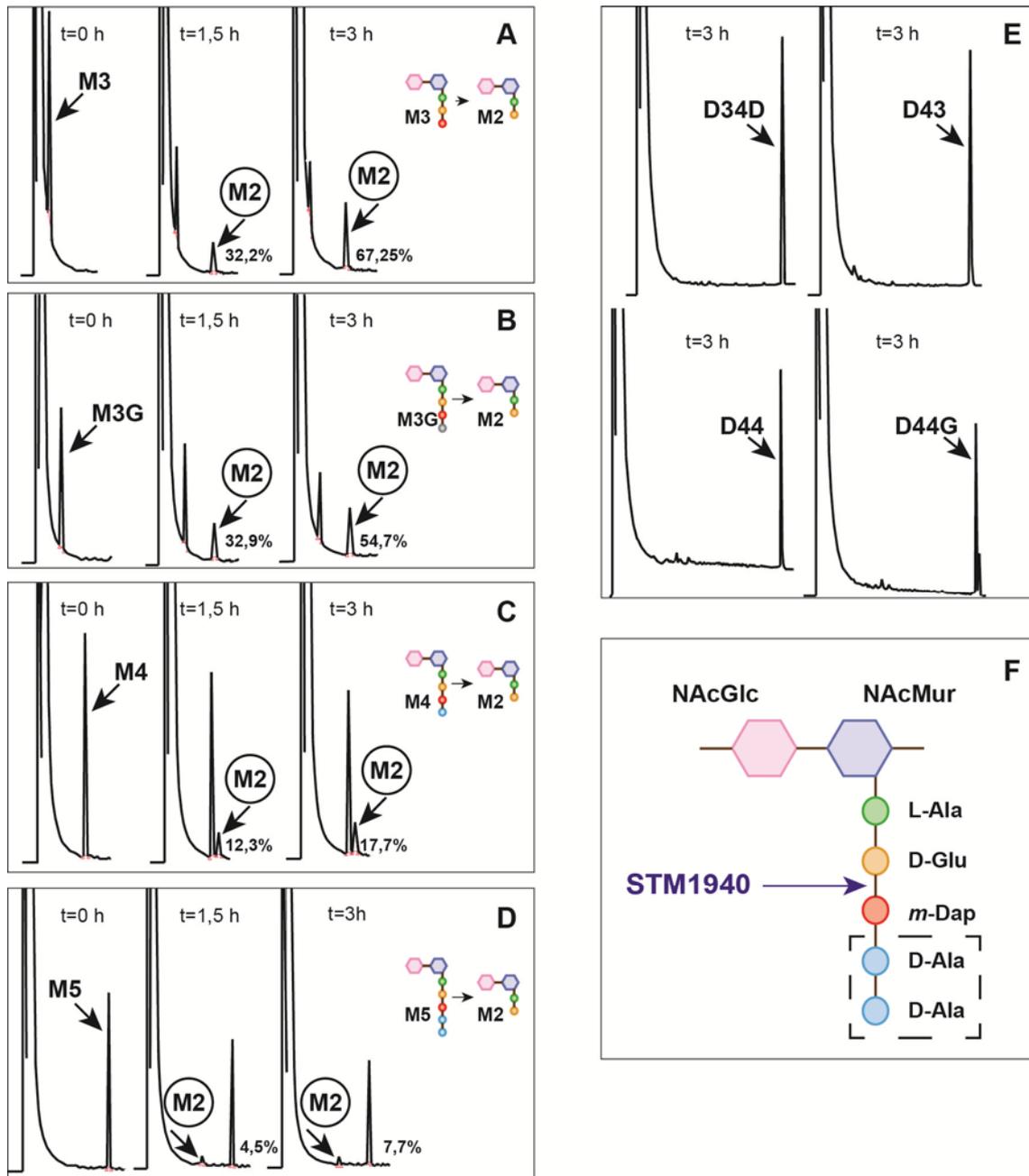


Figura 55. STM1940 muestra actividad DL-endopeptidasa/DL-carboxipeptidasa sobre muropéptidos no entrecruzados. Actividad de STM1940 sobre: **(A)** el muropéptido M3 (NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap); **(B)** el muropéptido M3G (NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-Gly); **(C)**: el muropéptido M4 (NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-D-Ala); **(D)**: el muropéptido M5 (NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-D-Ala-D-Ala). En todos los casos el producto resultante de la reacción es M2 (NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu). Se indica el porcentaje de M2 obtenido sobre el total de muropéptido utilizado como sustrato. Se muestran los perfiles de HPLC de los muropéptidos a tiempo 0, 1,5 h y 3 h de incubación con la enzima. **E:** Obsérvese la ausencia de actividad de STM1940 sobre los dímeros: D34D (NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-*m*-Dap-(D-Ala)-D-Glu-L-Ala-NAcMur-NAcGlc), D43 (NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-D-Ala-*m*-Dap-D-Glu-L-Ala-NAcMur-NAcGlc), D44G (NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-D-Ala-*m*-Dap-(D-Ala-Gly)-D-Glu-L-Ala-NAcMur-NAcGlc) y D44 (NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-D-Ala-*m*-Dap-(D-Ala)-D-Glu-L-Ala-NAcMur-NAcGlc). Se muestran los perfiles de HPLC de los muropéptidos tras 3 h de incubación con la enzima. **F:** enlace propuesto como diana de la actividad DL-endopeptidasa/DL-carboxipeptidasa de STM1940. En el recuadro se señalan los aminoácidos cuya presencia no es esencial para la actividad de la proteína.

5.5 Contribución de STM1940 en la virulencia de *S. Typhimurium*

El hecho de que *S. Typhimurium* aumente la producción de STM1940 dentro de células eucariotas nos llevó a analizar en modelos de infección una posible contribución de la proteína en virulencia. Utilizamos el mutante $\Delta STM1940::kan$ en el modelo de infección *in vitro* en fibroblastos de rata NRK-49F así como en el modelo *in vivo* de ratón. En los ensayos *in vitro* de infección de fibroblastos, ya descritos en el capítulo 3, el mutante $\Delta STM1940::kan$ no presenta diferencias significativas respecto a la estirpe silvestre (**Fig. 26A**), aunque cabría destacar una mayor cantidad de bacteria intracelular en todos los tiempos post-infección analizados, 2, 24 y 48 h (**Fig. 26C**). Esta ligera diferencia sugería que STM1940 podría contribuir a la supervivencia de la bacteria intracelular.

Los ensayos de infección *in vivo* en ratones BALB/c mostraron datos más concluyentes. Las pruebas de competición de la estirpe silvestre con $\Delta STM1940::kan$ demostraron que *S. Typhimurium* utiliza STM1940 para colonizar el hígado y el bazo cuando se administra por vía intraperitoneal (**Fig. 56**).

Todos estos datos ponen de manifiesto que STM1940 es una peptidasa que actúa sobre la cadena peptídica lateral de muropéptidos no entrecruzados y que es necesaria para que *S. Typhimurium* cause una infección sistémica en el modelo de ratón.

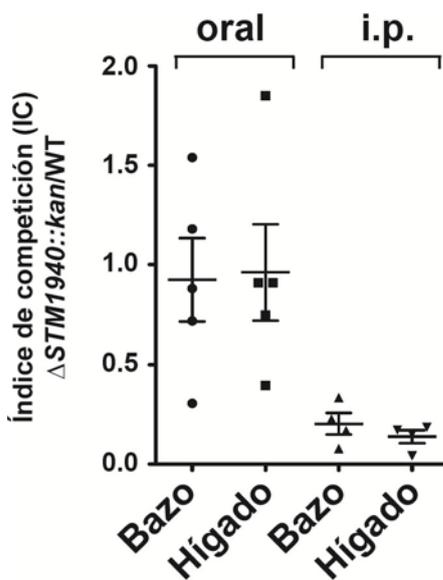
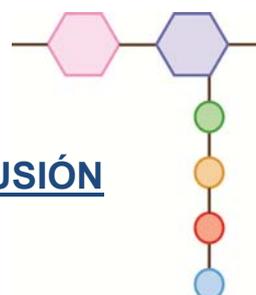


Figura 56. STM1940 contribuye a la virulencia de *S. Typhimurium* en ratones BALB/c. La falta de STM1940 reduce el “fitness” de *S. Typhimurium* en ratones BALB/c tras una administración intraperitoneal (i.p). Obsérvese que no hay efecto tras una administración oral. Se muestran los índices de competición (IC) de $\Delta STM1940::kan$ frente a la estirpe silvestre (WT) tanto en bazo como en hígado. Los extractos de los órganos se prepararon tras 5 días (oral) o 48 h (i.p) de la infección de los ratones. Se realizó el análisis estadístico de los datos mediante ANOVA de una vía y post-test de Bonferroni, comparando las medias entre todas las estirpes analizadas.

DISCUSIÓN



El peptidoglicano es una macromolécula que rodea por completo a la bacteria, siendo producido por la práctica totalidad de géneros bacterianos. Esta macromolécula experimenta continuos cambios en su estructura cuando la célula bacteriana se adapta a distintas condiciones ambientales. La plasticidad estructural es, de hecho, una de las características que explican el éxito del peptidoglicano en términos evolutivos como molécula esencial en la fisiología bacteriana. Estos cambios en el peptidoglicano contribuyen también en la virulencia, en el caso de algunas bacterias patógenas y, en la supervivencia en situaciones de estrés, como la exposición a antibióticos (Cava & de Pedro, 2014).

Un aspecto importante que permite que ocurran cambios estructurales de diversa magnitud en el peptidoglicano es la regulación espacio-temporal de las enzimas que participan en su biosíntesis y remodelación. Los datos obtenidos en condiciones de laboratorio indican que existe una notable redundancia de actividad entre las enzimas implicadas en el metabolismo del peptidoglicano, siendo la gran mayoría dispensables (van Heijenoort, 2011; Denome *et al.*, 1999). A nuestro entender, el trabajo presentado en esta Tesis pone de manifiesto un aspecto adicional, como es la producción simultánea de muchas enzimas, algunas de ellas con la misma actividad, en una determinada condición de crecimiento. Este fenómeno ya conocido para la familia de PBPs de alto y bajo peso molecular, no había, hasta nuestro conocimiento, sido explorado a nivel de producción de proteína en otros grupos de enzimas con otras actividades sobre el peptidoglicano.

A pesar de existir una aparente redundancia de enzimas que cubren, desde el punto de vista bioquímico, todos los enlaces de la malla del peptidoglicano, es llamativo el que algunas bacterias patógenas posean enzimas adicionales para actuar sobre enlaces que, teóricamente, son ya blancos de otras enzimas. Un ejemplo representativo son las muramidasa codificadas en islas de patogenicidad junto a sistemas de secreción que liberan toxinas o translocan proteínas efectoras a la célula eucariota. Estas muramidasa específicas de bacterias patógenas, como la muramidasa TtsA de *S. Typhi*, necesaria para la liberación de la toxina tifoidea, presentan diferencias puntuales en la región de asociación a peptidoglicano que se ha propuesto podrían diferenciarlas de las muramidasa codificadas en genomas de muchos bacteriófagos (Hodak & Galán, 2013).

Nosotros hemos identificado *in silico* hasta un total de cinco genes de *S. Typhimurium* que codifican enzimas con posible actividad sobre el peptidoglicano y que no están presentes en el genoma de *E. coli* K-12 MG1655. Para el producto de uno de estos genes, *STM1940*, además de estudiar sus niveles de transcripción y producción de la proteína, pudimos demostrar actividad peptidasa sobre la cadena peptídica lateral de muropeptidos no entrecruzados. Los otros cuatro genes, *STM1910* (PBP 2*), *STM1836* (PBP 3*), *STM3277* y *STM4217*, fueron igualmente caracterizados en relación a sus niveles de transcripción y producción de la proteína, quedando pendiente su purificación y demostración de actividad sobre peptidoglicano. Estas tareas están en marcha, en especial, la producción de PBP 2* y PBP 3* para intentar su cristalización y entender, mediante su estructura, si podrían haberse especializado en actuar sobre un determinado sustrato. *STM1940* es también objeto de estudio para intentar obtener su estructura atómica. Con los datos de que disponemos y los presentes en la literatura, parece más probable la implicación de estas enzimas específicas en virulencia o, extrapolando aún más, en el establecimiento del estado de persistencia de *S. Typhimurium* en el interior de fibroblastos. Esta idea viene apoyada por estudios que demuestran que determinadas modificaciones en el peptidoglicano, sólo detectadas en

bacterias patógenas y que implican la pérdida o la ganancia de grupos químicos en las cadenas glucídicas o en las peptídicas, confieren resistencia a las defensas del hospedador (Sukhithasri *et al.*, 2013; Humann & Lenz, 2009). Es posible que las bacterias patógenas puedan, no sólo modificar sino también, eliminar activamente de su peptidoglicano determinados muropéptidos que son blancos de receptores de defensa del hospedador. Esta hipótesis tendría un fuerte sustento en el caso de los patógenos bacterianos intracelulares. Una vez que estos patógenos entran en la célula eucariota, uno de sus objetivos podría ser disminuir el reconocimiento por los receptores intracelulares de la familia Nod (Nod1 y Nod2) que unen muramil-péptidos (Philpott *et al.*, 2014; Caruso *et al.*, 2014).

La maquinaria enzimática del peptidoglicano de *S. Typhimurium* en bacteria intracelular

Parte de los trabajos realizados en esta Tesis se centraron en la caracterización de las PBPs específicas del género *Salmonella*, la PBP 2* (*STM1910*) y la PBP 3* (*STM1836*). Ambas comparten el dominio TP presente en el resto de PBPs (PBP 1A, PBP 1B, PBP 1C, PBP 2 y PBP 3) capaces de establecer enlaces DD entre el grupo *m*-Dap y el D-Ala en posiciones tres y cuatro de cadenas peptídicas adyacentes. Esta conservación sugiere que la PBP 2* y la PBP 3* podrían ser enzimas de “biosíntesis” del peptidoglicano, estableciendo entrecruzamientos entre, quizás, muropéptidos de una estructura singular. Nuestros estudios mostraron que las PBPs esenciales PBP 2 y PBP 3 se expresan más en bacteria intracelular en estado de proliferación (células epiteliales HeLa) que en la bacteria extracelular utilizada para infectar (inóculo) o en bacteria que establece un estado de persistencia intracelular (fibroblastos) (**Fig. 16**). Sin embargo, la PBP 2* se expresa preferencialmente en bacteria intracelular en estado de no proliferación, tanto en fibroblastos humanos (BJ-5ta) como de rata (NRK-49F). Con respecto a la PBP 3*, observamos que su expresión aumenta en bacteria intracelular con respecto al inóculo, independientemente del estado de crecimiento. Estos resultados apoyan la idea de una adquisición de estas enzimas en *Salmonella* ligada a su evolución como patógeno intracelular. Cabe destacar que datos obtenidos en el serovar Enteritidis en un modelo de macrófagos de pollo, demuestran que el gen *pbpA2*, con una homología del 60 % con el gen *pbpA* de *E. coli* (PBP 2), está implicado en virulencia (Zhao *et al.*, 2002). Este gen *pbpA2* presenta además una identidad >99 % a nivel de nucleótidos con un gen de *S. Typhimurium* flanqueado por *argS*, lo que nos indica que es el ortólogo de *STM1910* (PBP 2*). De interés, el promotor de *pbpA2* del serovar Enteritidis es ácido-inducible (Valdivia & Falkow, 1996). Esta regulación sugiere que la PBP 2 de *S. Enteritidis* podría contribuir a la supervivencia intracelular de la bacteria en un ambiente con un bajo pH como el que hay en el interior de la SCV (“*Salmonella Containing Vacuole*”). Además, la observación de que *pbpA* es incapaz de complementar la función de *pbpA2* indica que, a pesar de compartir el dominio TP, estos dos genes tienen, claramente, funciones distintas (Zhao *et al.*, 2002).

Nuestros datos relativos a PBP 2* obtenidos con el serovar Typhimurium en el modelo de infección persistente en fibroblastos, en el que observamos un fuerte aumento en los niveles de esta enzima en bacteria intracelular, sugieren una posible función en el interior de la célula eucariota. Considerando que la PBP 2 también fue detectada en los ensayos de Western en bacteria intracelular, parece poco probable que se produzca un fenómeno de sustitución de funciones entre la PBP 2 y la PBP 2*. Nuestra hipótesis contempla más un probable estado de cooperación en la actividad de ambas enzimas, bien a nivel de utilización de distintos sustratos o de actuación en distintas regiones topológicas del peptidoglicano. El hecho de que un mutante

deficiente en la PBP 2* no presente deficiencias en la supervivencia intracelular en el fibroblasto sugiere, además, que la actividad de la PBP 2* por sí sola no es esencial en la infección. Esta característica se da en algunas enzimas con actividad de biosíntesis en el peptidoglicano, como ocurre en el caso de la PBP 1A y la PBP 1B. Curiosamente, el análisis genético mostró que una deficiencia simultánea en PBP 2*, PBP 3* y PBP 1B compromete la adaptación de *S. Typhimurium* al estado de persistencia en el interior del fibroblasto. Esta situación recuerda de alguna forma la letalidad asociada a la pérdida simultánea de las actividades de la PBP 1A y la PBP 1B (Vollmer & Bertsche, 2008).

Varios géneros bacterianos, entre los que se encuentra *Bacillus*, esporulan ante situaciones de estrés, como la limitación de nutrientes. Las esporas sobreviven en un estado metabólicamente inerte durante largos periodos de tiempo y exhiben resistencia extrema a un amplio rango de agentes dañinos. El estado de persistencia de *S. Typhimurium* en la SCV que se forma en el fibroblasto podría representar igualmente un estado de letargo con baja actividad metabólica para resistir frente a las condiciones intracelulares extremas. SpoVD es una PBP de alto peso molecular de clase B que es esencial para la síntesis del peptidoglicano durante la esporulación de *B. subtilis* (Bukowska-Faniband & Hederstedt, 2013). SpoVD tiene un dominio transpeptidasa (TP) que contribuye a la síntesis del peptidoglicano en estas condiciones. La ausencia de *spoVD* conduce a la formación de esporas sin peptidoglicano, motivo por el cual son sensibles al calor. Este resultado sugiere que otras enzimas con actividad TP no son capaces de compensar la falta de SpoVD (Bukowska-Faniband & Hederstedt, 2013). Se podría postular un fenómeno similar cuando se produce la pérdida simultánea de PBPs específicas de *Salmonella* (PBP 2* y PBP 3*) y de PBP 1B, no quedando una PBP alternativa que pueda cumplir sus funciones en bacteria intracelular que persiste en el interior del fibroblasto.

Dentro del grupo de enzimas del peptidoglicano de *S. Typhimurium* comunes a las conocidas en *E. coli* y con actividad de biosíntesis (BIO), pudimos observar expresión diferencial en algunas de ellas, incluyendo las que poseen actividad transglicosilasa (TG). La bacteria utilizada para la infección (inóculo) produce las PBPs bifuncionales 1A y 1B a niveles comparables, mientras que la bacteria intracelular produce más PBP 1A en relación a 1B. Esta diferencia podría indicar un papel más importante de la PBP 1A en el interior de la célula eucariota, principalmente en el caso de células epiteliales HeLa. Este hecho contrasta, sin embargo, con el hecho de que la ausencia de PBP 2*, PBP 3* y PBP 1B sea la combinación que más altera el comportamiento de la bacteria intracelular, fenotipo que no se observa en la deficiencia de PBP 2*, PBP 3* y PBP 1A. La funcionalidad de PBP 1A y PBP 1B depende de dos lipoproteínas de membrana externa, LpoA y LpoB, respectivamente (Paradis-Bleau *et al.*, 2010). En *Vibrio cholerae*, la PBP 1A y LpoA parecen tener un papel más importante en generar y mantener la pared celular que la PBP1B/LpoB (Dörr *et al.*, 2014b). Así, mientras que los mutantes *mrcB* o *lpoB* exhiben un crecimiento similar al de la estirpe silvestre, los mutantes *mrcA* o *lpoA* presentan claros fenotipos. Estos incluyen deficiencias de crecimiento en medio mínimo o en medios que contienen sales biliares, además de pérdida de “fitness” en ensayos de competición con la estirpe silvestre tanto en modelos de infección *in vitro* como *in vivo* en el intestino delgado de ratones recién nacidos (Dörr *et al.*, 2014b). En el caso de *S. Typhimurium*, no observamos diferencias entre los mutantes sencillos carentes de PBP 1A o PBP 1B con respecto a la morfología y resto de fenotipos ensayados. Por otro lado, en *V. cholerae* se ha descrito una enzima, CsiV (“Cell shape

integrity Vibrio”), que modula la síntesis de peptidoglicano y por lo tanto influye en la morfología y el crecimiento de la bacteria. CsiV interacciona directamente con LpoA y promueve su función como activadora de la PBP 1A (Dörr *et al.*, 2014a). Sería de interés en trabajos futuros analizar si *S. Typhimurium* utiliza una proteína con función similar que promueva una mayor expresión de la PBP 1A en bacteria intracelular.

Una observación adicional de nuestros análisis a nivel de proteína fue el aumento apreciable de la transglicosilasa MtgA en bacteria intracelular respecto a la del inóculo. Además, MtgA apenas se expresa en bacteria extracelular crecida en distintos medios de laboratorio. Todo ello nos hace pensar que MtgA pudiera ser una transglicosilasa monofuncional con un papel importante durante la infección. La contribución de MtgA al proceso de infección se describió previamente en *Brucella abortus* (Canavessi *et al.*, 2004). *Brucella* es capaz de sobrevivir intracelularmente durante largos periodos de tiempo para lo que requiere, entre otros, de la estabilidad en la estructura del peptidoglicano. Un mutante de *B. abortus* carente de MtgA no muestra defectos en su capacidad de crecimiento en medios de cultivo. MtgA tampoco es esencial para el mantenimiento o la replicación intracelular en la infección de macrófagos. Sin embargo, aunque MtgA no es necesaria en las etapas tardías de la infección en el modelo de ratón, juega un papel importante durante el establecimiento inicial de la infección (2-6 semanas pi). La deficiencia de MtgA se asocia con un retraso en la muerte de los ratones (Canavessi *et al.*, 2004). En nuestro modelo *in vitro* utilizando fibroblastos de rata NRK-49F comprobamos que MtgA no es necesaria para la persistencia intracelular del patógeno, lo que podría considerarse un resultado similar a lo que sucede con *B. abortus* en macrófagos. Considerando estos resultados, se analizará en un modelo de infección animal si la deficiencia de MtgA causa en *S. Typhimurium* cambios en su comportamiento. Estos experimentos están programados para realizarse en nuestro laboratorio en un futuro próximo.

En *S. Typhimurium* identificamos hasta siete LD-transpeptidasas (LD-TPs), una de las cuales, STM3277, es específica del género *Salmonella*. Las LD-TPs son de importancia ya que establecen enlaces peptídicos entre dos residuos *m*-Dap de cadenas adyacentes o entre un residuo *m*-Dap y la lipoproteína de Braun (Lpp). Este conjunto de enzimas son insensibles a los β -lactámicos (Magnet *et al.*, 2007). En *E. coli* cultivada en medio de cultivo hasta fase de crecimiento estacionaria el porcentaje de muropeptidos con entrecruzamientos *m*-Dap-*m*-Dap es mayor que en fase exponencial (Glauner *et al.*, 1988). Nosotros comprobamos que este cambio estructural también tiene lugar en *S. Typhimurium*, donde se pasa de un 2,5 % de enlaces *m*-Dap-*m*-Dap en fase exponencial a un 8 % en fase estacionaria. La cantidad relativa de Lpp unida al peptidoglicano también aumenta (del 6,1 % al 14,1 %) en fase estacionaria. En bacteria intracelular obtenida de células epiteliales HeLa, también aumentan los entrecruzamientos de tipo *m*-Dap-*m*-Dap (10,2 % a 9 hpi respecto al 8 % del inóculo), mientras que la Lpp unida al peptidoglicano sufre un descenso (11,2 % a 9 hpi respecto al 14,1 % del inóculo) (Quintela *et al.*, 1997). En *Mycobacterium tuberculosis* hasta un 80 % de los entrecruzamientos en fase estacionaria son de tipo LD (Gupta *et al.*, 2010). La relevancia de los enlaces LD en *M. tuberculosis* se hace patente en un mutante que carece de dos de sus LD-TPs, Ldt1 y Ldt2. Este doble mutante presenta alteraciones en su morfología, tamaño y velocidad de crecimiento *in vitro* e *in vivo* además de aumentar la susceptibilidad a algunos β -lactámicos como la amoxicilina y la vancomicina (Schoonmaker *et al.*, 2014). Este doble mutante presenta también una fuerte atenuación de su virulencia, siendo incapaz

de causar patología o muerte en ratones BALB/c. Este defecto se debe principalmente a la ausencia de Ldt2, ya que la mera ausencia de esta enzima conduce a una atenuación del crecimiento que se acentúa en el doble mutante carente de Ldt1 y Ldt2. De interés, las otras tres LD-TPs descritas en *M. tuberculosis* no son esenciales en ninguno de los modelos de virulencia ensayados y su ausencia tampoco causa alteraciones en la fisiología de la bacteria (Schoonmaker *et al.*, 2014).

En el caso de *S. Typhimurium* nuestros resultados demuestran que la carencia de las siete LD-TPs que identificamos en este patógeno no produce ninguna alteración en su comportamiento en ratones BALB/c infectados por vía intraperitoneal (i.p). Además, tampoco observamos diferencias en la morfología de estas bacterias cultivadas en condiciones de laboratorio. Esto nos lleva a postular sobre la posible existencia en *S. Typhimurium* de genes adicionales a los identificados y que codifiquen enzimas de tipo LD-TP. A nivel de proteína, nuestras observaciones concuerdan con una actuación de las LD-TPs identificadas tanto en fase estacionaria como en el ambiente intracelular del fibroblasto, siendo ambas condiciones en las que los enlaces LD aumentan en su proporción. La presencia de estas enzimas es importante en las fases de crecimiento donde no hay suficiente cantidad de pentapéptidos (fase estacionaria) necesarios para el establecimiento de los enlaces DD (Glauner *et al.*, 1988). YbiS es la enzima que se produce a niveles mayores en bacteria intracelular y se encarga de establecer enlaces entre las cadenas peptídicas y la Lpp. ErfK también parece ser importante en el ambiente intracelular para el establecimiento de los enlaces entre el peptidoglicano y la Lpp al aparecer en niveles muy altos en esta condición. Por otro lado, YnhG, otra proteína abundante en bacteria intracelular, podría establecer los enlaces LD entre cadenas peptídicas adyacentes. Comparando los niveles de estas enzimas en bacteria extracelular e intracelular, podría postularse que los enlaces de tipo LD podrían tener un papel importante en la remodelación del peptidoglicano durante la infección de la célula eucariota.

Otra observación de nuestro estudio en bacteria intracelular refiere a enzimas caracterizadas por su papel en la modificación del peptidoglicano en distintas condiciones de crecimiento. Nuestros resultados apuntan a distintos niveles de expresión en bacteria intracelular dependiendo de la enzima analizada. La PBP 6B (*dacD*), con actividad DD-carboxipeptidasa (DD-CPasa), parece ser de gran importancia en el establecimiento de la infección en células eucariotas. De este modo, la PBP 6B pasa de una situación en la que no se observa su expresión en la bacteria empleada como inóculo, a presentar unos niveles elevados de expresión tanto en fibroblastos humanos BJ-5ta y de rata NRK-49F, como en células epiteliales HeLa. Otras DD-CPasas, como las PBPs 5 (*dacA*) y 6 (*dacC*), también tienen niveles elevados de expresión en bacteria intracelular. Este hecho indicaría una posible baja cantidad de pentapéptidos en el peptidoglicano de bacteria intracelular, lo que concordaría con la elevada expresión de las LD-TPs en el interior de la célula eucariota. Respecto a la actividad DD-endopeptidasa (DD-EPasa), actuarían más la PBP 7 (*pbpG*) y AmpH (*ampH*) que la PBP 4 (*dacB*), ya que las dos primeras presentan un aumento de su expresión en los distintos tipos celulares respecto al inóculo. Se ha descrito la implicación de la PBP 7 en un proceso de infección para *Acinetobacter baumannii*, donde esta enzima es importante para la supervivencia de la bacteria durante la infección pulmonar (Russo *et al.*, 2009). Dentro de las enzimas implicadas en la modificación del peptidoglicano y que son insensibles a penicilina, MepA e YdhO, presentan una expresión casi

inapreciable en bacteria intracelular. Por otro lado, Spr, NlpC y STM1940 podrían ser importantes durante la infección, ya que presentan elevados niveles de expresión en bacteria intracelular. Entre ellas destaca, especialmente, STM1940 con un claro aumento de su expresión respecto a la bacteria del inóculo. A pesar de los niveles apreciables de estas enzimas en bacteria intracelular, los respectivos mutantes sólo presentaron alteraciones morfológicas cuando existía deficiencia en la PBP 5 (*dacA*) y en todas las condiciones ensayadas, recordando el fenotipo ya descrito anteriormente en *E. coli* (de Pedro *et al.*, 2003; Nelson & Young, 2000). Las alteraciones morfológicas se acentuaban cuando, junto con la PBP 5, se eliminaban otros genes que codifican enzimas con actividad en la modificación del peptidoglicano. Algunas de las combinaciones de mutaciones realizadas en genes que codifican estas enzimas de modificación condujeron a un fenotipo de filamentación parcial, fenotipo que aparecía en fase exponencial en medio LB. Explicamos este fenómeno por un probable defecto en la división asociado a la deficiencia en la DD-EPasa YibP (EnvC). Esta enzima, además de tener esta actividad DD-EPasa, contiene un dominio LytM. Los dominios LytM se han descrito como implicados en la regulación de amidasas del peptidoglicano (Uehara *et al.*, 2010). Algunas de estas amidasas, como AmiC, participan activamente en la separación del peptidoglicano del septo y de las células hijas (Uehara *et al.*, 2009), lo que podría explicar el fenotipo de filamentación del mutante deficiente en YibP (EnvC). Otras proteínas de *S. Typhimurium* con dominios LytM son NlpD, YebA e YgeR. Con respecto a YibP (EnvC) y NlpD, se las considera activadoras de la hidrólisis de peptidoglicano al comportarse como reguladores positivos de amidasas (Ercoli *et al.*, 2015). Esa regulación explica que la mutación de uno de ellos provoque el crecimiento en filamentos al igual que sucede al mutar las amidasas. Por otro lado, YebA e YgeR sólo parecen tener papeles minoritarios en la separación celular aunque su deficiencia, junto a la de YibP y NlpD, exacerba el crecimiento como filamentos. Se ha postulado que YebA, cuya deficiencia por sí sola no conduce a filamentación, podría ser más importante para facilitar el crecimiento de la mureína generando “huecos” en el peptidoglicano preexistente (Singh *et al.*, 2012). Curiosamente, datos recientes indican que la función de estos dominios LytM, especialmente el presente en NlpD, juegan un papel importante en la colonización del intestino por *V. cholerae* utilizando el modelo de ratón (Moll *et al.*, 2014).

Las enzimas que hidrolizan los enlaces glicosídicos de las cadenas de azúcares del peptidoglicano cumplen un papel esencial en la biosíntesis. En *S. Typhimurium*, las transglicosilasas líticas MltA, MltB y EmtA son producidas por la bacteria en cantidades elevadas tanto en el ambiente extracelular como una vez en el interior de fibroblastos o células epiteliales. Este resultado nos lleva a pensar que el acortamiento de la cadena de azúcares contribuye a la remodelación del peptidoglicano que tiene lugar durante la infección. Mientras que MltB y EmtA actúan como endo- y como exoenzimas, cortando enlaces entre NAcMur y NAcGlc en cualquier posición de la cadena glucídica, MltA sólo actúa como exoenzima, es decir, cortando la cadena de azúcares por el extremo (Lee *et al.*, 2014). En cierta similitud a nuestro modelo de persistencia de *S. Typhimurium* en el interior de la célula eucariota, se ha demostrado que la germinación de esporas requiere la activación de transglicosilasas líticas (TLs) que degraden el peptidoglicano del córtex de la espora. La enzima SleB, presente en el género *Bacillus* así como en algunas especies de *Clostridium*, es un ejemplo de estas TLs específicas de la germinación (Heffron *et al.*, 2009). SleB sólo reconoce como sustrato peptidoglicano del córtex de la espora y no peptidoglicano de células vegetativas. De este modo, esta enzima sólo es activa ante la presencia de un grupo δ -lactámico unido al NAcMur, característico del peptidoglicano de la espora (Jing *et al.*, 2012). Nuestros

resultados en *S. Typhimurium* demuestran que la expresión de MltC, una TL que puede actuar como endo- o exoglicosilasa, disminuye en bacteria intracelular. Este dato sugiere, o bien que su actividad no es requerida durante el proceso de infección o que pueda estar regulada negativamente por el patógeno durante la infección para evitar la liberación de muropeptidos reconocidos por receptores de defensa de la familia Nod (Boudreau *et al.*, 2012). Este fenómeno de represión de algunas TLs en la bacteria intracelular también se observó para Slt, la transglicosilasa lítica soluble. En *Neisseria gonorrhoeae* existe un homólogo de Slt denominado LdtA. Los productos de la actividad enzimática de LdtA activan Nod1 (Chan *et al.*, 2012). Unos niveles de expresión bajos de Slt podrían, por tanto, contribuir a disminuir la activación de los receptores Nod1 tras la infección por *S. Typhimurium*. Respecto a los fenotipos obtenidos en los mutantes con deficiencias múltiples de TLs, algunas con distinta especificidad de sustrato (Lee *et al.*, 2014), cabe señalar la filamentación asociada a la pérdida de Slt, MltD, EmtA y MltC. A pesar de la baja expresión en bacteria extracelular tanto de Slt como de MltD y de que este mutante múltiple sigue teniendo una elevada expresión de MltA y MltB, parece que estas dos enzimas no son capaces de restablecer la pérdida de actividad de las otras. Esta observación nos hace también ser cautos sobre la importancia relativa asignada a una determinada enzima en la adaptación a la vida intracelular de *S. Typhimurium*, la cual puede no estar directamente relacionada con los niveles de producción de la misma.

En referencia al conjunto de amidasas del peptidoglicano y su función en la infección intracelular, no fuimos capaces de obtener información sobre la producción de varias de ellas, ya que su etiquetado causaba efectos polares sobre los genes adyacentes. De aquella que pudimos etiquetar, AmiC, sólo sabemos que su expresión es muy baja en bacteria intracelular y que está implicada en el proceso de división celular (Yang *et al.*, 2012). Este hecho, concuerda con las bajas tasas de crecimiento y división mostradas por la bacteria intracelular que persiste en el fibroblasto. En el análisis fenotípico de mutantes observamos que, la ausencia de una de las enzimas con actividad amidasa (Ami), apenas provoca efectos ni en la velocidad de crecimiento ni en la morfología. Sin embargo, la pérdida simultánea de varias enzimas con esta actividad amidasa (AmiA, AmiB, AmiC y AmpD) resulta en la incapacidad de la bacteria para dividirse generando largos filamentos que no pueden invadir la célula eucariota. Este fenotipo de filamentación, muy acusada debido a la pérdida de varias amidasas, ya fue descrito en *E. coli* (Priyadarshini *et al.*, 2007). Este fenotipo de filamentación disminuye paulatinamente a medida que hay menos amidasas delecionadas en la misma estirpe. La pérdida simultánea de sólo dos amidasas como AmiA y AmiB sigue, no obstante, provocando filamentación en una gran proporción de las bacterias en comparación con otras combinaciones de dobles mutantes. En *V. cholerae* sólo se ha descrito AmiB, y su deleción provoca el crecimiento de la bacteria en largas cadenas similares a las observadas en *S. Typhimurium* tras la deleción de AmiA, AmiB y AmiC (véase **figura 31**). Además, AmiB de *V. cholerae* es reclutada al sitio de la división celular por proteínas que contienen el dominio LytM como YibP (EnvC) y NlpD, un fenómeno que tiene lugar durante las últimas etapas de la separación de las células hijas (Moll *et al.*, 2014). En *S. Typhimurium*, el doble mutante $\Delta amiA \Delta amiB$ prolifera más en el interior del fibroblasto en comparación a su estirpe parental, comportamiento ligado a una menor tasa de invasión. Esta alteración en el ambiente intracelular nos hace pensar que las amidasas, en particular AmiA y AmiB, podrían ser enzimas importantes para el establecimiento del estado de persistencia de *S. Typhimurium* en el interior de células eucariotas.

Una ruta importante en el metabolismo del peptidoglicano es el proceso de reciclaje, el cual asegura la recuperación de fragmentos liberados durante la remodelación del peptidoglicano y que serán empleados durante etapas subsiguientes de biosíntesis. La elevada expresión en bacteria intracelular de algunas de las proteínas implicadas en el reciclaje (NagZ, LdcA, Mpl), nos hace pensar que este proceso es de gran importancia durante la infección intracelular. La remodelación del peptidoglicano provoca la liberación del 40-50 % de esta estructura en cada generación, quedando acumulado alrededor del 90 % de este material en el periplasma desde donde se reintroduce al citoplasma para su reciclaje (Johnson *et al.*, 2013). De este modo, el proceso de reciclaje evita la liberación masiva de fragmentos de peptidoglicano. Como ya hemos discutido anteriormente con otras actividades enzimáticas de hidrólisis, la presencia de fragmentos del peptidoglicano en el periplasma, que eventualmente puedan ser posteriormente liberados fuera de la bacteria, aumentaría el riesgo de reconocimiento por receptores Nod (Philpott *et al.*, 2014). Ensayos de infección *in vivo* realizados con *Shigella* demuestran que un mutante $\Delta mppA$, deficiente en una enzima periplásmica que transfiere al citoplasma tripéptidos derivados del peptidoglicano (Park *et al.*, 1998), está fuertemente atenuado. Esta atenuación se demostró que estaba ligada a la liberación aumentada de péptidos hacia el exterior por este mutante, fenómeno que dispara la señalización de NF- κ B mediada por Nod1 y por Nod2, conduciendo a un aumento de IFN γ y, por consiguiente, a la eliminación del patógeno (Nigro *et al.*, 2008). Una gran mayoría de aislados de *Neisseria meningitidis* colonizan asintóticamente la nasofaringe, comportamiento que se ha asociado a la gran eficiencia de reciclaje (el 96 % de los fragmentos de su peptidoglicano se reciclan), lo que podría contribuir a pasar “inadvertido” a los sistemas de defensa del hospedador (Woodhams *et al.*, 2013). Podríamos, por tanto, especular sobre una baja tasa de liberación de fragmentos de peptidoglicano como una estrategia del patógeno para sobrevivir en los tejidos del hospedador y evadir la defensa inmunitaria. En el caso de la infección persistente de fibroblastos por *S. Typhimurium*, en la que el patógeno se enfrenta a una situación de limitación de nutrientes, una alta tasa de reciclaje del peptidoglicano podría suplir además la falta de muropéptidos sintetizados *de novo*. Este modelo contrasta en parte con la ausencia de fenotipo en fibroblastos del mutante múltiple de *S. Typhimurium* carente de AmpD, LdcA y NagZ, proteínas involucradas en el reciclaje del peptidoglicano. Este dato nos hace pensar que, o bien existen otras enzimas que las pudieran estar reemplazando o que la bacteria intracelular produce una pequeña cantidad de precursores *de novo* suficiente para mantener la estructura del peptidoglicano y, por lo tanto, la integridad de la bacteria.

Los datos obtenidos en bacteria intracelular sobre la maquinaria enzimática del peptidoglicano nos permiten describir, de forma tentativa, cómo cambia dicha maquinaria cuando *S. Typhimurium* infecta la célula eucariota y, por consiguiente, cómo podría remodelarse la estructura del peptidoglicano durante esta transición.

La alta expresión de las DD-CPasas PBP 5, PBP 6 y PBP 6B en bacteria intracelular indica que la cantidad de pentapéptidos podría ser baja. Además, los entrecruzamientos entre las cadenas peptídicas laterales podrían ser establecidos principalmente por enzimas LD-TPs resultando en una elevada cantidad de entrecruzamientos *m*-Dap-*m*-Dap. MepA, la enzima encargada de romper los enlaces *m*-Dap-*m*-Dap, apenas se expresa en bacteria intracelular, lo que refuerza la idea de que este tipo de enlaces es importante durante la colonización de la célula

eucariota. Unido a ello, podrían seguir estableciéndose, aunque en menor medida, enlaces de tipo DD, ya que sigue habiendo expresión de enzimas DD-TPs.

Las PBP con actividad DD-EPasa rompen enlaces entre cadenas peptídicas adyacentes. Dentro de este grupo, PBP 7 y AmpH aumentan su expresión en bacteria intracelular, lo que sugiere la incorporación de nuevo material al peptidoglicano incluso cuando la bacteria no presenta crecimiento activo. Otras enzimas con esta actividad pero insensibles a penicilina, Spr y NlpC, tienen también niveles elevados de expresión en bacteria intracelular. Spr y NlpC comparten el dominio NlpC_P60 con STM1940, proteína específica de *Salmonella* que aumenta mucho su expresión en bacteria intracelular. Spr, además, también tiene actividad LD-CPasa que transforma un tetrapéptido en un tripéptido que favorece la formación de enlaces entre dos *m*-Dap, ya referidos anteriormente como favorecidos durante la infección intracelular. Los niveles elevados de las Tls MltA, MltB y EmtA en bacteria intracelular, sugieren que hay hidrólisis de peptidoglicano y, por lo tanto, una remodelación acusada del mismo para mantener la viabilidad del patógeno en el interior de la célula infectada. El establecimiento de los enlaces glucosídicos puede ser realizado por cualquiera de las transglicosilasas aunque MgtA, la única transglicosilasa monofuncional, parece ser de gran importancia en bacteria intracelular. La presencia de pocos nutrientes en el ambiente intracelular y la elevada expresión de enzimas encargadas del reciclaje del peptidoglicano, parecen sugerir que la mayoría del material que se incorpora proviene de muropéptidos reciclados.

La estructura del peptidoglicano de *S. Typhimurium* en estado no proliferativo

Tras analizar a 24 hpi la estructura del peptidoglicano de *S. Typhimurium* en el interior de fibroblastos, fuimos capaces de identificar un muropéptido (al que se denominó por su posición en el HPLC como B/B') ausente en el peptidoglicano de bacteria extracelular y en el de bacteria obtenida del interior de células epiteliales HeLa (Quintela *et al.*, 1997). Esta notable especificidad sobre la condición en la que el muropéptido B/B' es sintetizado, la infección persistente del fibroblasto, nos llevó a analizar en detalle su estructura y mecanismo de formación. El estudio de este muropéptido mediante espectrometría de masas mostró que se trata de un monómero tripeptídico con un aminoalcohol en cuarta posición, es decir, NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-aminoalcohol. Este aminoalcohol, por su masa, podría ser bien alaninol (2-amino-1-propanol) o bien 1-amino-2-propanol, descartando otros compuestos por no tener un grupo amino (NH₂) capaz de establecer el enlace peptídico con el grupo hidroxilo (OH) libre del *m*-Dap. En un primer momento, pensamos que el aminoácido de la cuarta posición de la cadena peptídica era una glicina ya que la diferencia de masas entre éste y alguno de los aminoalcoholes citados está entre 0,03 y 0,05 Da. La precisión del equipo ESI-QTOF empleado para los análisis de masa de estos muropéptidos permitió establecer de forma inequívoca la diferencia de masa entre ellos y, por lo tanto, la identificación del aminoalcohol como sustituyente de la posición cuatro de la cadena peptídica. Hasta el momento, no hemos podido definir cuál de los dos posibles aminoalcoholes es el que forma parte del muropéptido de la bacteria intracelular, ni si está en su forma D o L. En la mayoría de las bacterias, los únicos D-aminoácidos producidos en cantidades significativas son D-alanina (D-Ala) y D-glutámico (D-Glu), los cuales son necesarios para la síntesis del peptidoglicano. Los D-aminoácidos confieren, además, resistencia frente a la mayoría de las proteasas conocidas y, por lo tanto, probablemente constituyan una adaptación bacteriana para proteger la estructura de una macromolécula esencial para su viabilidad. Los D-aminoácidos

son sintetizados por racemasas específicas que catalizan la transformación del aminoácido en forma L a su enantiómero D (Cava *et al.*, 2011a). *S. Typhimurium* tiene dos racemasas de alanina, DadX y Alr, siendo Alr la que produce la D-Ala que es empleada en la formación de los muropéptidos precursores para la biosíntesis de peptidoglicano (Galakatos *et al.*, 1986). En ciertas bacterias, como *V. cholerae*, hay una racemasa de amplio espectro periplásmica, BsrV, encargada de sintetizar D-aminoácidos no canónicos (NCDAA-“Non-Canonical D-Amino Acids”), como D-metionina (D-Met), D-leucina (D-Leu), D-valina (D-Val) y D-isoleucina (D-Ile) capaces de modular el metabolismo del peptidoglicano, sobretodo en fase estacionaria. Estos NCDAA regulan negativamente la biosíntesis de peptidoglicano con el objetivo de adaptarse a las condiciones limitantes en nutrientes (Lam *et al.*, 2009). Esta modulación ocurre tras la incorporación de estos NCDAA a la cadena lateral de los muropéptidos, la cual puede estar mediada por enzimas periplásmicas, como las LD-TPs, así como por enzimas citoplasmáticas capaces de incorporar estos NCDAA a los precursores del peptidoglicano (Cava *et al.*, 2011b). La falta de incorporación de NCDAA que ocurre de forma natural en *V. cholerae* provoca hipersensibilidad a choque osmótico además de un exceso de peptidoglicano en la pared celular. No todas las bacterias sintetizan estos NCDAA. Su producción se ha detectado en *Pseudomonas aeruginosa*, *B. subtilis* y *S. aureus*, mientras que *E. coli* y *Caulobacter crescentus* no son aparentemente capaces de sintetizarlos. Sin embargo, todas las bacterias son capaces de incorporarlos en el peptidoglicano si se suministran exógenamente, es decir, la capacidad de incorporar NCDAA es independiente de su síntesis. En *V. cholerae*, la D-Met se incorpora en las posiciones cuatro y cinco de la fracción peptídica de los muropéptidos, estando la mayor parte remplazando la D-Ala de la posición cuatro, posición que ocupa el aminoalcohol del muropéptido de *S. Typhimurium* identificado en bacteria intracelular. En *V. cholerae* se ha identificado también que la incorporación de la D-Met en la posición cuatro es catalizada por una LD-TP que transfiere el enlace LD del centro L del *m*-Dap al grupo amino del D-aminoácido aceptor (Cava *et al.*, 2011b). Los ensayos que realizamos en *S. Typhimurium* basados en la incorporación del reactivo ICPL demostraron que el aminoalcohol está unido al grupo hidroxilo libre del *m*-Dap, es decir, presenta el mismo enlace que presenta la glicina cuando está en esa posición. Este dato tendría significación biológica porque la bacteria podría utilizar la misma enzima para ambos procesos, produciéndose el cambio en el aminoácido que se incorpora. Hasta el momento, no hemos podido identificar cuál es la enzima encargada de catalizar la reacción aunque pensamos que podría ser una LD-TP, al igual que sucede con la incorporación de D-Met. De las cinco LD-TPs descritas en *E. coli*, parece que YcbB e YnhG son las que catalizan en más de un 75 % de los casos la adición de D-Met (Cava *et al.*, 2011b). Nosotros hemos realizado ensayos añadiendo D/L-alaninol/1-amino-2-propanol al medio de cultivo con el fin de inducir *in vitro* la síntesis del muropéptido identificado en bacteria intracelular y de este modo tener suficiente cantidad de muropéptido para poderlo analizar mediante resonancia magnética nuclear (RMN). Esta técnica nos permitiría aclarar cuál de los aminoalcoholes es el localizado en la posición cuatro de la cadena peptídica. Lamentablemente, todos estos intentos fueron infructuosos, por lo que no disponemos en la actualidad de suficiente cantidad de muropéptido para realizar estudios de RMN. En un futuro, se intentará sintetizar químicamente un M3-alaninol y un M3-1-amino-2-propanol, aunque esta tarea significará, sin duda, un proceso laborioso. Otros ensayos programados incluyen la purificación de LD-TPs que son producidas a niveles elevados por *S. Typhimurium* en el interior de la célula eucariota para, posteriormente, comprobar la capacidad de incorporación de estos aminoalcoholes a sáculo entero o a muropéptido aislado.

Con relación al mecanismo de incorporación, la presencia del aminoalcohol en la cuarta posición del muropeptido “intracelular” puede explicarse por fenómenos sustancialmente diferentes, que incluyen: i) la transformación de la D-Ala presente en la cuarta posición a alaninol mediante reacciones de reducción que ocurrirían en el periplasma y que implicarían un estado intermedio de aldehído (carboxilo→aldehído→alcohol); ii) la síntesis del aminoalcohol en el citoplasma de la bacteria y posterior incorporación al precursor lipídico I; y, iii) su incorporación por una LD-TP a una cadena lateral tripeptídica tras su captación, bien del medio de cultivo o bien desde el interior de la célula eucariota. El primer mecanismo no parece viable, ya que en el periplasma bacteriano no hay ATP que permita estas reacciones de reducción que demandan mucha energía. Respecto a la incorporación desde el medio de cultivo, tampoco parece ser viable ya que el DMEM no tiene alanina que se pueda transformar en aminoalcohol mediante reacciones de reducción. Una de las opciones que manejamos con más posibilidades es que la célula eucariota sintetice este aminoalcohol y que, tras su incorporación a la bacteria por un transportador, una enzima del tipo LD-TP expresada por la bacteria intracelular lo incorpore a la cadena lateral peptídica.

S. Typhimurium se localiza en el interior de fibroblastos dentro de una vacuola, la SCV, a través de la cual se produce un intercambio de nutrientes y moléculas pequeñas que promueven la interacción patógeno-hospedador. Este intercambio de nutrientes con el ambiente se suele producir a través de transportadores ABC (“*ATP-Binding Cassettes*”). En *S. Typhimurium* existe el operón *daI/STUV*, conservado en todas las especies de *Salmonella*. Este operón codifica para un transportador ABC, siendo DaIS la proteína periplásmica de unión a ligando, DaIT y DaIV las proteínas transmembrana y DaIU la ATPasa citoplasmática. Los ligandos específicos de DaIS son la D-Ala y la glicina. Además, *daIS* está coregulado por SPI-2 mediante activación directa por SsrB, lo que sugiere que esta proteína tiene un papel durante la infección intracelular (Osborne *et al.*, 2012). Por lo tanto, ya que nuestro aminoalcohol tiene una masa tan similar a la de la glicina, DaIS podría ser su transportador específico capaz de incorporarlo al periplasma de la bacteria en el interior de la SCV y de ahí que, posiblemente una LD-TP, catalice la reacción de sustitución en la cadena peptídica. Una purificación del peptidoglicano de bacteria intracelular utilizando un mutante $\Delta daIS$ podría dar una respuesta a esta hipótesis, aunque el trabajo asociado es laborioso y llevaría tiempo. Respecto a la posibilidad de que el aminoalcohol sea sintetizado en el citoplasma de *S. Typhimurium*, en el interior de *Salmonella* sólo se ha identificado la presencia de D-1-amino-2-propanol, no de alaninol. El D-1-amino-2-propanol está formando parte de la molécula de vitamina B₁₂. Esta vitamina puede sintetizarse *de novo* en condiciones de anaerobiosis y es un cofactor necesario para varias reacciones enzimáticas (Grabau & Roth, 1992). CobD es la enzima encargada de la síntesis del D-1-amino-2-propanol mediante la descarboxilación de la L-treonina, y además, muestra estereoespecificidad por el isómero L. La única evidencia de presencia de alaninol en bacterias la hemos encontrado en la especie *Mycobacterium intracellulare*. En esta especie bacteriana se ha descrito la presencia de alaninol formando parte de la estructura de glicopeptidolípidos, que se disponen en la superficie celular (Matsunaga *et al.*, 2012). Estos glicopeptidolípidos están formados por un núcleo lipopeptídico consistente en una cadena de ácidos grasos modificada (C₂₆-C₃₄) unida al tetrapéptido (Phe-Thr-Ala-alaninol) (Vats *et al.*, 2012). La incorporación del aminoalcohol en la cadena peptídica lateral tiene que ser realizada por una LD-TP, ya que sabemos que el carbono donador del *m*-Dap es un carbono L y, por lo tanto, el carbono aceptor del aminoalcohol tiene que ser un carbono D.

Ninguno de los enantiómeros (D o L) del 1-amino-2-propanol tiene un grupo NH₂ unido a un carbono quiral, grupo necesario para establecer el enlace peptídico con el OH libre del *m*-Dap de la cadena peptídica. El D-alaninol, sin embargo, sí tiene un carbono quiral al que está unido un NH₂, por lo que podría establecer el enlace peptídico con el *m*-Dap. Por lo tanto, a nivel estructural, el aminoalcohol con mayor probabilidad de estar formando parte del muropéptido B/B' es el D-alaninol. La presencia de alguno de estos aminoalcoholes en la estructura del peptidoglicano de *S. Typhimurium* en bacteria intracelular podría proporcionar a la bacteria intracelular la plasticidad necesaria para modificar el peptidoglicano de modo que éste sea importante para la virulencia y la supervivencia en condiciones extremas

Identificación de una enzima específica de *Salmonella* con actividad DL-endopeptidasa e inducida en el interior de la célula eucariota.

Los resultados obtenidos con la enzima STM1940 proporcionan, a nuestro conocimiento actual, la primera demostración de una enzima implicada en el metabolismo del peptidoglicano que es específica de un patógeno y que se induce en el interior de células eucariotas. STM1940, es una DL-endopeptidasa (DL-EPasa) que corta el enlace D-Glu-*m*-Dap (iE-Dap) en muropéptidos monoméricos y es, además, necesaria para la virulencia de *S. Typhimurium*. Este resultado refuerza la idea de que el remodelado del peptidoglicano es esencial para que muchos patógenos tengan éxito en el proceso de infección. Ante una situación para evadir el sistema inmunitario de la célula eucariota, se podría postular que *S. Typhimurium* induce STM1940 en el interior de células eucariotas con el fin de disminuir la señalización por Nod1, que reconoce específicamente muropéptidos que contienen el motivo iE-Dap. Esta estrategia tiene algún paralelismo con la descrita en *Legionella pneumophila*, la cual una vez dentro de los macrófagos utiliza la proteína efectora EnhC para inhibir la función de Slt (Liu *et al.*, 2012). Evitar cortes en las cadenas glucídicas por Slt podría reducir la liberación de muramil-péptidos desde el peptidoglicano macromolecular. Es importante resaltar que cuando la proteína STM1940 purificada se incubaba con sáculo completo, no se detectan cambios en el perfil de muropéptidos en el HPLC (véase **figura A9** del anexo I). Este resultado parece indicar que las dianas de STM1940 son los muropéptidos que contienen el motivo iE-Dap y que han sido liberados previamente desde el peptidoglicano por la actividad de alguna TL. Este mecanismo difiere de otros que incluyen la translocación de proteínas efectoras de *S. Typhimurium* para estimular Nod1 y Nod2 por interacciones directas proteína-proteína (Keestra *et al.*, 2013; Keestra *et al.*, 2011). Nuestros datos sugieren por tanto, que *S. Typhimurium* intracelular podría manipular la señalización de Nod1 restringiendo la disponibilidad de moléculas inductoras derivadas del peptidoglicano. También es importante resaltar que pequeños cambios estructurales en el peptidoglicano, como en la longitud de las cadenas glucídicas o en el grado de entrecruzamiento, pueden influenciar el resultado de la infección. Esta idea está respaldada con un estudio reciente que muestra que algunas PBPs de *S. aureus* son dispensables para el crecimiento en condiciones de laboratorio pero necesarias para la patogenicidad (Reed *et al.*, 2015).

STM1940 está codificada en una isla genómica compuesta por tres genes y un pseudogen. La mayoría de las hidrolasas del peptidoglicano adquiridas por transferencia horizontal son muramidases codificadas en profagos, restos de fagos, o están unidas funcionalmente a islas de patogenicidad que codifican sistemas de secreción tipo III y tipo IV (Zahl *et al.*, 2005). Búsquedas realizadas en BLAST muestran que ni STM1940 ni los productos de los dos genes flanqueantes tienen similitud con enzimas de peptidoglicano conocidas de fagos o sistemas de

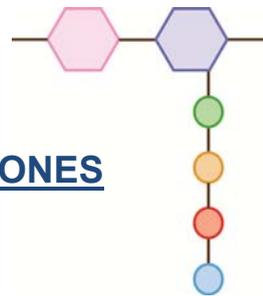
secreción. La isla genómica que contiene el gen *STM1940* podría haberse especializado en la modificación del peptidoglicano y, probablemente, haber contribuido a la evolución de *S. Typhimurium* como patógeno intracelular. Trabajos futuros deberían descifrar si alguno de los genes flanqueantes, ambos de función desconocida, contribuyen al papel de *STM1940* como DL-EPasa. Análisis de expresión génica basados en fusiones reporteras muestran que el gen flanqueante *STM1941* está co-expresado con *STM1940*. Este dato sugiere que, al menos estos dos genes, podrían tener funciones relacionadas.

Una característica interesante observada para *STM1940* es su inducción en condiciones asociadas a un cese del crecimiento activo (fase estacionaria), en persistencia en el interior de células eucariotas y durante el crecimiento en medios limitantes en nutrientes. *STM1940* parece haber evolucionado como una hidrolasa que actúa preferencialmente en respuesta a estrés nutricional. Bajo esta situación, el reciclaje del peptidoglicano, el cual emplea los muropéptidos liberados en el periplasma como resultado de la actividad de las TLs para reutilizarlos en siguientes procesos de síntesis, juega un papel importante en supervivencia (Park & Uehara, 2008). Se podría postular a *STM1940* como posible modulador de la ruta de reciclaje. En esta ruta, la permeasa AmpG transporta al citoplasma anhidro-muropéptidos, como el anhidro-M3 (NAcGlc-anhNAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap). Sin embargo, no hay estudios que hayan analizado si el muropéptido anhidro-M2 (NAcGlc-anhNAcMur-L-Ala-D-Glu), producto de la actividad de *STM1940* en el periplasma, sería un posible sustrato para AmpG. Puesto que AmpG es capaz de transportar el disacárido NAcGlc-anhNAcMur así como anhidro-M3 y anhidro-M4 al citoplasma, no parece haber una razón aparente por la que no sea capaz de transportar también el muropéptido anhidro-M2. Esta posible conexión entre la actividad de *STM1940* y el reciclaje del peptidoglicano en *S. Typhimurium* tanto extra- como intracelular merece, a nuestro entender, ser estudiada en un futuro.

Nuestros resultados también revelan que *STM1940* está regulado por el regulador principal de la virulencia PhoP. En *S. Typhimurium*, PhoP regula muchos genes adquiridos por transferencia génica horizontal (Perez & Groisman, 2009), incluyendo *pcgL* que codifica una dipeptidasa D-Ala-D-Ala periplásmica (Hilbert *et al.*, 1999). PcgL modula negativamente la virulencia de *S. Typhimurium* (Mouslim *et al.*, 2002), un papel que contrasta con el requisito de *STM1940* para causar enfermedad sistémica. La contribución de *STM1940* a la virulencia de *S. Typhimurium* concuerda con el estudio que Chaudhuri y colaboradores desarrollaron en diferentes modelos animales (Chaudhuri *et al.*, 2013). Estos autores emplearon grupos de mutantes de *S. Typhimurium* obtenidos por mutagénesis al azar con transposón para identificar genes importantes para la colonización intestinal de vacas, cerdos y pollos. Sus datos, depositados en una página web (<http://lin5.schef.ac.uk/dalliance/>), muestran que las inserciones en *STM1940* son seleccionadas negativamente *in vivo*. Hasta el momento, desconocemos la razón por la que, en el modelo tifoideo de ratón, *STM1940* es necesaria para la virulencia cuando la bacteria es administrada intraperitonealmente y no por ruta oral. La entrada por estas dos rutas difiere respecto a los tipos celulares hospedadores que la bacteria encuentra en los primeros estados de la infección (Mastroeni & Grant, 2013; Watson & Holden, 2010), y esto podría afectar a la supervivencia intracelular del mutante. Además, el modelo tifoideo de ratón no es comparable al de vaca, cerdo o pollo en relación con la estimulación de la inflamación durante el curso de la infección.

En resumen, STM1940 es una nueva DL-endopeptidasa/DL-carboxipeptidasa del peptidoglicano identificada en esta Tesis, inducida por *S. Typhimurium* en el interior de células eucariotas y controlada por un regulador esencial para la virulencia. Nuestro objetivo futuro será analizar cómo la actividad de STM1940 sobre el peptidoglicano es capaz de modular la adaptación de este patógeno a un estilo de vida intracelular en la célula eucariota en el que se mantiene una tasa baja de proliferación.

CONCLUSIONES



El trabajo experimental llevado a cabo en esta Tesis Doctoral dio lugar a las siguientes conclusiones:

Primera. Las enzimas del peptidoglicano específicas del género *Salmonella* a las que hemos denominado PBP 2* y PBP 3*, son producidas por *S. Typhimurium* en el interior de fibroblastos BJ-5ta y NRK-49F, y en células epiteliales HeLa, a mayores niveles de los detectados en bacteria extracelular.

Segunda. La enzima PBP 6B de *S. Typhimurium*, implicada en la modificación del peptidoglicano, difícilmente detectable en la bacteria utilizada para infectar las células eucariotas, es fuertemente inducida por la bacteria intracelular en el interior de fibroblastos BJ-5ta y NRK-49F, así como en células epiteliales HeLa. Esta regulación es opuesta a la observada para MepA, detectada a niveles altos en bacteria extracelular pero presente a niveles bajos en bacteria intracelular.

Tercera. MltA, EmtA y MltB son las enzimas con actividad de hidrólisis sobre el peptidoglicano de *S. Typhimurium* con mayores niveles de producción en bacteria intracelular obtenida de fibroblastos BJ-5ta y NRK-49F, así como en células epiteliales HeLa. Por el contrario, apenas se observa expresión de las hidrolasas Slt y AmiC en el interior de la célula eucariota.

Cuarta. NagZ, LdcA y Mpl, implicadas en el reciclaje del peptidoglicano de *S. Typhimurium*, son enzimas abundantes en bacteria intracelular obtenida de fibroblastos BJ-5ta y NRK-49F, así como en células epiteliales HeLa.

Quinta. La deficiencia simultánea de las enzimas PBP 1B, PBP 3* y PBP 2* en *S. Typhimurium* provoca un descenso de la viabilidad de la bacteria en el ambiente intracelular de fibroblastos NRK-49F respecto a la estirpe silvestre, tanto a 24 hpi ($p < 0,01$) como a 48 hpi ($p < 0,05$).

Sexta. El mutante múltiple de *S. Typhimurium* carente de siete LD-transpeptidasas (ErfK, YbiS, YcfS, YcbB, YnhG, YafK y STM3277) presenta, respecto a la estirpe silvestre, una baja tasa de invasión de fibroblastos NRK-49F, mientras que una vez en el ambiente intracelular, aumenta su tasa de proliferación a 24 hpi ($p < 0,05$).

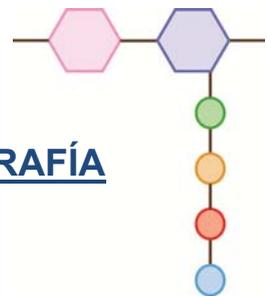
Séptima. La deficiencia simultánea de las transglicosilasas líticas de *S. Typhimurium* Slt, MltD, EmtA y MltC produce un fenotipo de filamentación que no se observa en otras combinaciones de mutaciones en genes que codifican enzimas del metabolismo del peptidoglicano con esta actividad.

Octava. El doble mutante $\Delta amiA \Delta amiB$ de *S. Typhimurium* presenta una mayor tasa de proliferación intracelular en fibroblastos estadísticamente significativa respecto a la estirpe silvestre ($p < 0,01$) a 24 y 48 hpi. Además, esta estirpe presenta un fenotipo de filamentación cuando crece en el medio rico LB.

Novena. El peptidoglicano de *S. Typhimurium* intracelular en estado no proliferativo (fibroblastos), contiene un muropéptido no entrecruzado, no descrito con anterioridad, y cuya masa es 928,4278 Da. Este muropéptido contiene un aminoalcohol (alaninol o 1-amino-2-propanol) en la cuarta posición de la cadena peptídica lateral.

Décima. La enzima STM1940, específica del género *Salmonella*, tiene actividad DL-endopeptidasa/DL-carboxipeptidasa, está regulada por el sistema de dos componentes PhoP-PhoQ y es necesaria para la virulencia de *S. Typhimurium* en ratones.

BIBLIOGRAFÍA



- Alonso A & García-del Portillo F (2004). Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens. *Int. Microbiol.* **7**: 181-191.
- Alvarez L, Espallat A, Hermoso JA, de Pedro MA & Cava F (2014). Peptidoglycan Remodeling by the Coordinated Action of Multispecific Enzymes. *Microb. Drug Resist.* **20**: 190-198.
- Anantharaman V & Aravind L (2003). Evolutionary history, structural features and biochemical diversity of the NlpC/P60 superfamily of enzymes. *Genome Biol.* **4**: R11.
- Aramini JM, Rossi P, Huang YJ, Zhao L, Jiang M, Maglaqui M, Xiao R, Locke J, Nair R, Rost B, Acton TB, Inouye M & Montelione GT (2008). Solution NMR Structure of the NlpC/P60 Domain of Lipoprotein Spr from *Escherichia coli*: Structural Evidence for a Novel Cysteine Peptidase Catalytic Triad. *Biochemistry* **47**: 9715-9717.
- Barreteau H, Kovac A, Boniface A, Sova M, Gobec S & Blanot D (2008). Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 168-207.
- Bäumler AJ (1997). The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*. *Trends Microbiol.* **5**: 318-322.
- Bäumler AJ, Winter SE, Thiennimitr P & Casadesús J (2011). Intestinal and chronic infections: *Salmonella* lifestyles in hostile environments. *Environ. Microbiol. Rep.* **3**: 508-17.
- Bergsbaken T, Fink SL & Cookson BT (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**: 99-109.
- Beuzón CR & Holden DW (2001). Use of mixed infections with *Salmonella* strains to study virulence genes and their interactions *in vivo*. *Microbes Infect.* **3**: 1345-1352.
- Den Blaauwen T, de Pedro MA, Nguyen-Distèche M & Ayala JA (2008). Morphogenesis of rod-shaped sacculi. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 321-344.
- Boudreau MA, Fisher JF & Mobashery S (2012). Messenger Functions of the Bacterial Cell Wall-derived Muropeptides. *Biochemistry* **51**: 2974-2990.
- Boyle EC, Bishop JL, Grassl GA & Finlay BB (2007). *Salmonella*: from Pathogenesis to Therapeutics. *J. Bacteriol.* **189**: 1489-1495.
- Braun V & Wolff H (1970). The murein-lipoprotein linkage in the cell wall of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **14**: 387-91.
- Bukowska-Faniband E & Hederstedt L (2013). Cortex synthesis during *Bacillus subtilis* sporulation depends on the transpeptidase activity of SpoVD. *FEMS Microbiol. Lett.* **346**: 65-72.
- Canavessi AMO, Harms J, Gatti N de L & Splitter GA (2004). The role of integrase/recombinase *xerD* and monofunctional biosynthesis peptidoglycan transglycosylase genes in the pathogenicity of *Brucella abortus* infection *in vitro* and *in vivo*. *Microb. Pathog.* **37**: 241-251.
- Cano DA, Dominguez-Bernal G, Tierrez A, Garcia-del Portillo F & Casadesús J (2002). Regulation of Capsule Synthesis and Cell Motility in *Salmonella enterica* by the Essential Gene *igaA*. *Genetics* **162**: 1513-1523.
- Cano DA, Martínez-Moya M, Pucciarelli MG, Groisman EA, Casadesús J & García-Del Portillo F (2001). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Response Involved in Attenuation of Pathogen Intracellular Proliferation. *Infect. Immun.* **69**: 6463-74.
- Cano DA, Pucciarelli MG, Martínez-Moya M, Casadesús J & García-del Portillo F (2003). Selection of small-colony variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in nonphagocytic eucaryotic cells. *Infect. Immunity* **71**: 3690-8.
- Cava F, Kuru E, Brun Y V. & de Pedro MA (2013). Modes of cell wall growth differentiation in rod-shaped bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **16**: 731-7.

- Cava F, Lam H, De Pedro MA & Waldor MK (2011a). Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**: 817-831.
- Cava F & de Pedro MA (2014). Peptidoglycan plasticity in bacteria: emerging variability of the murein sacculus and their associated biological functions. *Curr. Opin. Microbiol.* **18**: 46-53.
- Cava F, de Pedro MA, Lam H, Davis BM & Waldor MK (2011b). Distinct pathways for modification of the bacterial cell wall by non-canonical D-amino acids. *EMBO J.* **30**: 3442-3453.
- Chan K, Baker S, Kim CC, Detweiler CS, Dougan G & Falkow S (2003). Genomic Comparison of *Salmonella enterica* serovars and *Salmonella bongori* by Use of an *S. enterica* serovar Typhimurium DNA Microarray. *J. Bacteriol.* **185**: 553-563.
- Chan RK, Botstein D, Watanabe T & Ogata Y (1972). Specialized Transduction of Tetracycline Resistance by Phage P22 in *Salmonella* Typhimurium. II. Properties of a High-Frequency-Transducing Lysate. *Virology* **50**: 883-898.
- Chan YA, Hackett KT & Dillard JP (2012). The Lytic Transglycosylases of *Neisseria gonorrhoeae*. *Microb. Drug Resist.* **18**: 271-9.
- Chaudhuri RR, Morgan E, Peters SE, Pleasance SJ, Hudson DL, Davies HM, Wang J, van Diemen PM, Buckley AM, Bowen AJ, Pullinger GD, Turner DJ, Langridge GC, Turner AK, Parkhill J, Charles IG, Maskell DJ & Stevens MP (2013). Comprehensive Assignment of Roles for *Salmonella* Typhimurium Genes in Intestinal Colonization of Food-Producing Animals. *PLoS Genet.* **9**: 1-11.
- Cheng Q, Li H, Merdek K & Park JT (2000). Molecular Characterization of the beta-N-Acetylglucosaminidase of *Escherichia coli* and Its Role in Cell Wall Recycling. *J. Bacteriol.* **182**: 4836-4840.
- Cherepanov PP & Wackernagel W (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**: 9-14.
- Cho H, Uehara T & Bernhardt TG (2014). Beta-Lactam Antibiotics Induce a Lethal Malfunctioning of the Bacterial Cell Wall Synthesis Machinery. *Cell* **159**: 1300-1311.
- Dandekar T, Fieselmann A, Popp J & Hensel M (2012). *Salmonella enterica*: a surprisingly well-adapted intracellular lifestyle. *Front. Microbiol.* **3**: 1-11.
- Das D, Hervé M, Elsliger MA, Kadam RU, Grant JC, Chiu HJ, Knuth MW, Klock HE, Miller MD, Godzik A, Lesley SA, Deacon AM, Mengin-Lecreux D & Wilson IA (2013). Structure and Function of a Novel LD-Carboxypeptidase A Involved in Peptidoglycan Recycling. *J. Bacteriol.* **195**: 5555-5566.
- Datsenko KA & Wanner BL (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 6640-5.
- Davis KM & Weiser JN (2011). Modifications to the Peptidoglycan Backbone Help Bacteria To Establish Infection. *Infect. Immun.* **79**: 562-70.
- Deiwick J, Nikolaus T, Erdogan S & Hensel M (1999). Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. *Mol. Microbiol.* **31**: 1759-1773.
- Denome SA, Elf PK, Henderson TA, Nelson DE & Young KD (1999). *Escherichia coli* Mutants Lacking All Possible Combinations of Eight Penicillin Binding Proteins: Viability, Characteristics, and Implications for Peptidoglycan Synthesis. *J. Bacteriol.* **181**: 3981-93.
- Desmarais SM, de Pedro MA, Cava F & Huang KC (2013). Peptidoglycan at its peaks: How chromatographic analyses can reveal bacterial cell wall structure and assembly. *Mol. Microbiol.* **89**: 1-13.
- Dörr T, Lam H, Alvarez L, Cava F, Davis BM & Waldor MK (2014a). A Novel Peptidoglycan Binding Protein Crucial for PBP1A-Mediated Cell Wall Biogenesis in *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet.* **10**: 1-14.

- Dörr T, Möll A, Chao MC, Cava F, Lam H, Davis BM & Waldor MK (2014b). Differential Requirement for PBP1a and PBP1b in *In Vivo* and *In Vitro* Fitness of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* **82**: 2115-2124.
- Drecktrah D, Knodler LA, Ireland R & Steele-Mortimer O (2006). The Mechanism of *Salmonella* Entry Determines the Vacuolar Environment and Intracellular Gene Expression. *Traffic* **7**: 39-51.
- Ercoli G, Tani C, Pezzicoli A, Vacca I, Martinelli M, Pecetta S, Petracca R, Rappuoli R, Pizza M, Norais N, Soriani M & Aricò B (2015). LytM Proteins Play a Crucial Role in Cell Separation, Outer Membrane Composition, and Pathogenesis in Nontypeable *Haemophilus influenzae*. *MBio* **6**: 1-10.
- Eriksson S, Lucchini S, Thompson A, Rhen M & Hinton JCD (2003). Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* **47**: 103-118.
- Fass E & Groisman EA (2009). Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**: 199-204.
- Fink SL & Cookson BT (2007). Pyroptosis and host cell death responses during *Salmonella* infection. *Cell. Microbiol.* **9**: 2562-2570.
- Finlay BB & Falkow S (1988). Comparison of the invasion strategies used by *Salmonella* Choleraesuis, *Shigella flexneri* and *Yersinia enterocolitica* to enter cultured animal cells: endosome acidification is not required for bacterial invasion or intracellular replication. *Biochimie* **70**: 1089-1099.
- Flannagan RS, Cosío G & Grinstein S (2009). Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**: 355-366.
- Fritsche G, Nairz M, Libby SJ, Fang FC & Weiss G (2012). Slc11a1 (Nramp1) impairs growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in macrophages via stimulation of lipocalin-2 expression. *J. Leukoc. Biol.* **92**: 353-359.
- Galakatos NG, Daub E, Botstein D & Walsh CT (1986). Biosynthetic *alr* Alanine Racemase from *Salmonella* Typhimurium: DNA and Protein Sequence Determination. *Biochemistry* **25**: 3255-3260.
- Ganz T (2003). Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**: 710-720.
- Garai P, Gnanadhas DP & Chakravorty D (2012). *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi as model organisms. Revealing paradigm of host-pathogen interactions. *Virulence* **3**: 377-388.
- García-del Portillo F (2001). *Salmonella* intracellular proliferation: where, when and how? *Microbes Infect.* **3**: 1305-11.
- García-Del Portillo F & Finlay BB (1995). Targeting of *Salmonella* Typhimurium to Vesicles Containing Lysosomal Membrane Glycoproteins Bypasses Compartments with Mannose 6-Phosphate Receptors. *J. Cell Biol.* **129**: 81-97.
- Gerlach RG & Hensel M (2007). *Salmonella* Pathogenicity Islands in host specificity, host pathogen-interactions and antibiotics resistance of *Salmonella enterica*. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **7**: 317-327.
- Ghosh AS, Chowdhury C & Nelson DE (2008). Physiological functions of D-alanine carboxypeptidases in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol.* **16**: 309-17.
- Del Giudice MG, Ugalde JE & Czubener C (2013). A Lysozyme-Like Protein in *Brucella abortus* Is Involved in the Early Stages of Intracellular Replication. *Infect. Immun.* **81**: 956-964.
- Glauner B, Höltje J V. & Schwarz U (1988). The Composition of the Murein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**: 10088-95.
- Goehring NW & Beckwith J (2005). Diverse Paths to Midcell: Assembly of the Bacterial Cell Division Machinery. *Curr. Biol.* **15**: R514-26.

- Goffin C & Ghuysen JM (1998). Multimodular Penicillin-Binding Proteins: An Enigmatic Family of Orthologs and Paralogs. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 1079-1093.
- Goffin C & Ghuysen J-M (2002). Biochemistry and Comparative Genomics of SxxK Superfamily Acyltransferases Offer a Clue to the Mycobacterial Paradox: Presence of Penicillin-Susceptible Target Proteins versus Lack of Efficiency of Penicillin as Therapeutic Agent. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 702-38.
- Gog JR, Murcia A, Osterman N, Restif O, McKinley TJ, Sheppard M, Achouri S, Wei B, Mastroeni P, Wood JLN, Maskell DJ, Cicuta P & Bryant CE (2012). Dynamics of *Salmonella* infection of macrophages at the single cell level. *J. R. Soc. Interface* **9**: 2696-2707.
- Grabau C & Roth JR (1992). A *Salmonella* Typhimurium cobalamin-deficient mutant blocked in 1-amino-2-propanol synthesis. *J. Bacteriol.* **174**: 2138-44.
- Grant AJ, Foster GL, McKinley TJ, Brown SP, Clare S, Maskell DJ & Mastroeni P (2009). Bacterial Growth Rate and Host Factors as Determinants of Intracellular Bacterial Distributions in Systemic *Salmonella enterica* Infections. *Infect. Immun.* **77**: 5608-5611.
- Grassl GA & Finlay BB (2008). Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **24**: 22-6.
- Grassl GA, Valdez Y, Bergstrom KS, Vallance BA & Finlay BB (2008). Chronic enteric *Salmonella* infection in mice leads to severe and persistent intestinal fibrosis. *Gastroenterology* **134**: 768-80.
- Grimont PAD & Weill FX (2007). Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars.
- Groisman EA (2001). The Pleiotropic Two-Component Regulatory System PhoP-PhoQ. *J. Bacteriol.* **183**: 1835-1842.
- Gupta R, Lavollay M, Mainardi J-L, Arthur M, Bishai WR & Lamichhane G (2010). The *Mycobacterium tuberculosis* protein LdtMt2 is a nonclassical transpeptidase required for virulence and resistance to amoxicillin. *Nat. Med.* **16**: 466-469.
- Hanahan D (1983). Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Haneda T, Okada N, Kikuchi Y, Takagi M, Kurotaki T, Miki T, Arai S & Danbara H (2011). Evaluation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Choleraesuis *slyA* mutant strains for use in live attenuated oral vaccines. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **34**: 399-409.
- Haraga A, Ohlson MB & Miller SI (2008). Salmonellae interplay with host cells. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 53-66.
- Headley VL & Payne SM (1990). Differential protein expression by *Shigella flexneri* in intracellular and extracellular environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 4179-83.
- Heffron JD, Orsburn B & Popham DL (2009). Roles of Germination-Specific Lytic Enzymes CwJ and SleB in *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* **191**: 2237-2247.
- Heidrich C, Templin MF, Ursinus A, Merdanovic M, Berger J, Schwarz H, de Pedro MA & Höltje J V. (2001). Involvement of N-acetylmuramyl-L-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **41**: 167-78.
- Van Heijenoort J (2001). Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* **11**: 25R-36R.
- Van Heijenoort J (2011). Peptidoglycan hydrolases of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **75**: 636-63.
- Helaine S, Thompson JA, Watson KG, Liu M, Boyle C & Holden DW (2010). Dynamics of intracellular bacterial replication at the single cell level. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**: 3746-51.

- Hensel M (2004). Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int. J. Med. Microbiol.* **294**: 95-102.
- Hervé M, Boniface A, Gobec S, Blanot D & Mengin-Lecreux D (2007). Biochemical Characterization and Physiological Properties of *Escherichia coli* UDP-N-acetylmuramate: L-Alanyl-gamma-D-Glutamyl-meso-Diaminopimelate Ligase. *J. Bacteriol.* **189**: 3987-3995.
- Hilbert F, García-del Portillo F & Groisman EA (1999). A Periplasmic D-Alanyl-D-Alanine Dipeptidase in the Gram-Negative Bacterium *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* **181**: 2158-2165.
- Hodak H & Galán JE (2013). A *Salmonella* Typhi homologue of bacteriophage muramidases controls typhoid toxin secretion. *EMBO Rep.* **14**: 95-102.
- Höltje JV (1998). Growth of the Stress-Bearing and Shape-Maintaining Murein Sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 181-203.
- Humann, J, Lenz LL (2009). Bacterial peptidoglycan degrading enzymes and their impact on host muropeptide detection. *J. Innate Immun.* **1**: 88-97.
- Isaacson RE, Argyilan C, Kwan L, Patterson S & Yoshinaga K (1999). PHASE VARIABLE SWITCHING OF *IN VIVO* AND ENVIRONMENTAL PHENOTYPES OF *SALMONELLA* TYPHIMURIUM. *Adv. Exp. Med. Biol.* **473**: 281-289.
- Iwata R, Ito H, Hayashi T, Sekine Y, Koyama N & Yamaki M (1995). Stable and General-Purpose Chemiluminescent Detection System for Horseradish Peroxidase Employing a Thiazole Compound Enhancer and Some Additives. *Anal. Biochem.* **231**: 170-174.
- Jing X, Robinson HR, Heffron JD, Popham DL & Schubot FD (2012). The Catalytic Domain of the Germination-Specific Lytic Transglycosylase SleB from *Bacillus anthracis* Displays a Unique Active Site Topology. *Proteins* **80**: 2469-2475.
- Johnson JW, Fisher JF & Mobashery S (2013). Bacterial cell-wall recycling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1277**: 54-75.
- Keestra a. M, Winter MG, Auburger JJ, Frässle SP, Xavier MN, Winter SE, Kim A, Poon V, Ravesloot MM, Waldenmaier JF. T, Tsolis RM, Eigenheer RA & Bäumlér AJ (2013). Manipulation of small Rho GTPases is a pathogen-induced process detected by NOD1. *Nature* **496**: 233-7.
- Keestra AM, Winter MG, Klein-douwél D, Xavier MN, Winter SE, Kim A, Tsolis RM & Bäumlér AJ (2011). A *Salmonella* Virulence Factor Activates the NOD1 / NOD2 Signaling Pathway. *MBio* **2**: 1-10.
- Kelly BG, Vespermann A & Bolton DJ (2009). Horizontal gene transfer of virulence determinants in selected bacterial foodborne pathogens. *Food Chem. Toxicol.* **47**: 969-77.
- King DT, Lameignere E & Strynadka NCJ (2014). Structural insights into the lipoprotein outer-membrane regulator of penicillin-binding protein 1B. *J. Biol. Chem.* **289**: 19245-19253.
- Klößner A, Otten C, Derouaux A, Vollmer W, Bühl H, De Benedetti S, Münch D, Josten M, Mölleken K, Sahl H-G & Henrichfreise B (2014). AmiA is a penicillin target enzyme with dual activity in the intracellular pathogen *Chlamydia pneumoniae*. *Nat. Commun.* **5**: 1-10.
- Kok-Fai. K, Lisa. S & Kalai. M (2012). Beta-lactam Antibiotics: From Antibiosis to Resistance and Bacteriology. *APMIS* **118**: 1-36.
- Kröger C, Dillon SC, Cameron ADS, Papenfort K, Sivasankaran SK, Hokamp K, Chao Y, Sittka A, Hebrard M, Handler K, Colgan A, Leekitcharoenphon P, Langridge GC, Lohan AJ, Loftus B, Lucchini S, Ussery DW, Dorman CJ, Thomson NR, Vogel J, *et al.* (2012). The transcriptional landscape and small RNAs of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**: E1277-E1286.

- Lam H, Oh D-C, Cava F, Takacs CN, Clardy J, de Pedro MA & Waldor M (2009). D-Amino Acids Govern Stationary Phase Cell Wall Remodeling in Bacteria. *Science* (80) **325**: 1552-1555.
- Lam LH & Monack DM (2014) Intraspecies Competition for Niches in the Distal Gut Dictate Transmission during Persistent *Salmonella* Infection. *PLoS Pathog.* **10**: 1-21.
- LaRock DL, Chaudhary A & Miller SI (2015). Salmonellae interactions with host processes. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**: 191-205.
- Lee M, Heseck D, Llarrull LI, Lastochkin E, Pi H, Boggess B & Mobashery S (2014). Reactions of All *E. coli* Lytic Transglycosylases with Bacterial Cell Wall. *J. Am. Chem. Soc.* **135**: 3311-3314.
- Lejona S, Aguirre A, Cabeza ML, García Véscovi E & Soncini FC (2003). Molecular characterization of the Mg²⁺-responsive PhoP-PhoQ regulon in *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* **185**: 6287-94.
- Liechti GW, Kuru E, Hall E, Kalinda A, Brun YV, VanNieuwenhze M & Maurelli AT (2014). A new metabolic cell-wall labelling method reveals peptidoglycan in *Chlamydia trachomatis*. *Nature* **506**: 507-10.
- Van der Linden MPG, Dehaan L, Hoyer MA & Keck W (1992). Possible Role of *Escherichia coli* Penicillin-Binding Protein-6 in Stabilization of Stationary-Phase Peptidoglycan. *J. Bacteriol.* **174**: 7572-7578.
- Liu M, Haenssler E, Uehara T, Losick VP, Park JT & Isberg RR (2012). The *Legionella pneumophila* EnhC Protein Interferes with Immunostimulatory Muramyl Peptide Production to Evade Innate Immunity. *Cell Host Microbe* **12**: 166-176.
- Lovering AL, Safadi SS & Strynadka NCJ (2012). Structural Perspective of Peptidoglycan Biosynthesis and Assembly. *Annu. Rev. Biochem.* **81**: 451-78.
- Luo C, Walk ST, Gordon DM, Feldgarden M, Tiedje JM & Konstantinidis KT (2011). Genome sequencing of environmental *Escherichia coli* expands understanding of the ecology and speciation of the model bacterial species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**: 7200-7205.
- Lupoli TJ, Lebar MD, Markovski M, Bernhardt T, Kahne D & Walker S (2014). Lipoprotein Activators Stimulate *Escherichia coli* Penicillin-Binding Proteins by Different Mechanisms. *J. Am. Chem. Soc.* **136**: 52-55.
- Lupoli TJ, Taniguchi T, Wang T-S, Perlstein DL, Walker S & Kahne DE (2009). Studying a Cell Division Amidase Using Defined Peptidoglycan Substrates. *J. Am. Chem. Soc.* **131**: 18230-18231.
- Lupoli TJ, Tsukamoto H, Doud EH, Wang TSA, Walker S & Kahne D (2011). Transpeptidase-mediated incorporation of D-amino acids into bacterial peptidoglycan. *J. Am. Chem. Soc.* **133**: 10748-10751.
- Macheboeuf P, Contreras-Martel C, Job V, Dideberg O & Dessen A (2006). Penicillin Binding Proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**: 673-91.
- Magnet S, Bellais S, Dubost L, Fourgeaud M, Mainardi J-L, Petit-Frère S, Marie A, Mengin-Lecreulx D, Arthur M & Gutmann L (2007). Identification of the L,D-Transpeptidases Responsible for Attachment of the Braun Lipoprotein to *Escherichia coli* Peptidoglycan. *J. Bacteriol.* **189**: 3927-31.
- Malik-Kale P, Winfree S & Steele-Mortimer O (2012). The Bimodal Lifestyle of Intracellular *Salmonella* in Epithelial Cells: Replication in the Cytosol Obscures Defects in Vacuolar Replication. *PLoS One* **7**: 1-10.
- Maloy SR (1990). Experimental techniques in bacterial genetics. *Jones Bartlett Publ. Bost.*
- Martínez-Moya M, de Pedro MA, Schwarz H & García-del Portillo F (1998). Inhibition of *Salmonella* intracellular proliferation by non-phagocytic eucaryotic cells. *Res. Microbiol.* **149**: 309-18.
- Mastroeni P & Grant A (2013). Dynamics of spread of *Salmonella enterica* in the systemic compartment. *Microbes Infect.* **15**: 849-857.
- Mastroeni P, Grant A, Restif O & Maskell D (2009). A dynamic view of the spread and intracellular distribution of *Salmonella enterica*. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**: 73-80.

- Matsunaga I, Komori T, Mori N & Sugita M (2012). Identification of a novel tetrapeptide structure of the *Mycobacterium avium* glycopeptidolipid that functions as a specific target for the host antibody response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **419**: 687-691.
- McDowall KJ, Lin-Chaol S & Cohen SN (1994). A + U Content Rather Than a Particular Nucleotide Order Determines the Specificity of RNase E Cleavage. *J. Biol. Chem.* **269**: 10790-10796.
- McGhie EJ, Brawn LC, Hume PJ, Humphreys D & Koronakis V (2009). *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**: 117-24.
- Mengin-Lecreux D, Van Heijenoort J & Park JT (1996). Identification of the *mpl* Gene Encoding UDP-N-Acetylmuramate: L-alanyl- gamma-D-Glutamyl-meso-Diaminopimelate Ligase in *Escherichia coli* and Its Role in Recycling of Cell Wall Peptidoglycan. *J. Bacteriol.* **178**: 5347-5352.
- Miao EA, Rajan J V. & Aderem A (2011). Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol. Rev.* **243**: 206-214.
- Moll A, Dorr T, Alvarez L, Chao MC, Davis BM, Cava F & Waldor MK (2014). Cell Separation in *Vibrio cholerae* Is Mediated by a Single Amidase Whose Action Is Modulated by Two Nonredundant Activators. *J. Bacteriol.* **196**: 3937-3948.
- Monack DM (2013). *Helicobacter* and *Salmonella* Persistent Infection Strategies. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **3**: 1-19.
- Monack DM, Bouley DM & Falkow S (2004). *Salmonella* Typhimurium persists within Macrophages in the Mesenteric Lymph Nodes of Chronically Infected Nramp1+/+ Mice and Can Be Reactivated by IFNgamma Neutralization. *J. Exp. Med.* **199**: 231-41.
- Moulim C, Hilbert F, Huang H & Groisman EA (2002). Conflicting needs for a *Salmonella* hypervirulence gene in host and non-host environments. *Mol. Microbiol.* **45**: 1019-1027.
- Nanninga N (1998). Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 110-29.
- Nelson DE & Young KD (2000). Penicillin Binding Protein 5 Affects Cell Diameter, Contour, and Morphology of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**: 1714-1721.
- Nigro G, Fazio LL, Martino MC, Rossi G, Tattoli I, Liparoti V, De Castro C, Molinaro A, Philpott DJ & Bernardini ML (2008). Muramylpeptide shedding modulates cell sensing of *Shigella flexneri*. *Cell. Microbiol.* **10**: 682-695.
- Núñez-Hernández C, Tierrez A, Ortega ÁD, Pucciarelli MG, Godoy M, Eisman B, Casadesús J & García-del Portillo F (2013). Genome Expression Analysis of Nonproliferating Intracellular *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Unravels an Acid pH-Dependent PhoP-PhoQ Response Essential for Dormancy. *Infect. Immun.* **81**: 154-165.
- Olricks NK, Aarsman MEG, Verheul J, Arnusch CJ, Martin NI, Hervé M, Vollmer W, de Kruijff B, Breukink E & den Blaauwen T (2011). A Novel *in vivo* Cell-Wall Labeling Approach Sheds New Light on Peptidoglycan Synthesis in *Escherichia coli*. *Chembiochem* **12**: 1124-33.
- Osborne SE, Tuinema BR, Mok MCY, Lau PS, Bui NK, Tomljenovic-Berube AM, Vollmer W., Zhang K, Junop M & Coombes BK (2012). Characterization of DalS, an ATP-binding Cassette Transporter for D-Alanine, and Its Role in Pathogenesis in *Salmonella enterica*. *J. Biol. Chem.* **287**: 15242-15250.
- Padalon-Brauch G, Hershberg R, Elgrably-Weiss M, Baruch K, Rosenshine I, Margalit H & Altuvia S (2008). Small RNAs encoded within genetic islands of *Salmonella* Typhimurium show host-induced expression and role in virulence. *Nucleic Acids Res.* **36**: 1913-1927.
- Paradis-Bleau C, Markovski M, Uehara T, Lupoli TJ, Walker S, Kahne DE & Bernhardt TG (2010). Lipoprotein Cofactors Located in the Outer Membrane Activate Bacterial Cell Wall Polymerases. *Cell* **143**: 1110-20.

- Park JT, Raychaudhuri D, Li H, Mengin-lecreulx D & Normark S (1998). MppA, a Periplasmic Binding Protein Essential for Import of the Bacterial Cell Wall Peptide L-Alanyl- γ -D-Glutamyl-meso-Diaminopimelate. *J. Bacteriol.* **180**: 1215-1223.
- Park JT & Uehara T (2008). How Bacteria Consume Their Own Exoskeletons (Turnover and Recycling of Cell Wall Peptidoglycan). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**: 211-227.
- Patel JC, Rossanese OW & Galán JE (2005). The functional interface between *Salmonella* and its host cell: Opportunities for therapeutic intervention. *Trends Pharmacol. Sci.* **26**: 564-570.
- de Pedro MA, Young KD, Ho J-V & Schwarz H (2003). Branching of *Escherichia coli* Cells Arises from Multiple Sites of Inert Peptidoglycan. *J. Bacteriol.* **185**: 1147-1152.
- Pennartz A, Génèreux C, Parquet C, Mengin-Lecreulx D & Joris B (2009). Substrate-Induced Inactivation of the *Escherichia coli* AmiD N-Acetylmuramoyl-L-Alanine Amidase Highlights a New Strategy To Inhibit This Class of Enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 2991-2997.
- Perez JC & Groisman EA (2009). Transcription factor function and promoter architecture govern the evolution of bacterial regulons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**: 4319-4324.
- Philpott DJ, Sorbara MT, Robertson SJ, Croitoru K & Girardin SE (2014). NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **14**: 9-23.
- Prats R & de Pedro MA (1989). Normal Growth and Division of *Escherichia coli* with a Reduced Amount of Murein. *J. Bacteriol.* **171**: 3740-3745.
- Priyadarshini R, de Pedro MA & Young KD (2007). Role of Peptidoglycan Amidases in the Development and Morphology of the Division Septum in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **189**: 5334-5347.
- Pucciarelli MG, Prieto AI, Casadesús J & García-del Portillo F (2002). Envelope instability in DNA adenine methylase mutants of *Salmonella enterica*. *Microbiology* **148**: 1171-1182.
- Quinn HJ, Cameron ADS & Dorman CJ (2014). Bacterial Regulon Evolution: Distinct Responses and Roles for the Identical OmpR Proteins of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* in the Acid Stress Response. *PLoS Genet.* **10**: 1-15.
- Quintela JC, Caparrós M & de Pedro MA (1995). Variability of peptidoglycan structural parameters in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **125**: 95-100.
- Quintela JC, de Pedro MA, Zöllner P, Allmaier G & Garcia-del Portillo F (1997). Peptidoglycan structure of *Salmonella* Typhimurium growing within cultured mammalian cells. *Mol. Microbiol.* **23**: 693-704.
- Reed P, Atilano ML, Alves R, Hoiczyc E, Sher X, Reichmann NT, Pereira PM, Roemer T, Filipe SR, Pereira-Leal JB, Ligoxygakis P & Pinho MG (2015). *Staphylococcus aureus* Survives with a Minimal Peptidoglycan Synthesis Machine but Sacrifices Virulence and Antibiotic Resistance. *PLOS Pathog.* **11**: 1-19.
- Rotger R & Casadesús J (1999). The virulence plasmids of *Salmonella*. *Int. Microbiol.* **2**: 177-84.
- Russo TA, MacDonald U, Beanan JM, Olson R, MacDonald IJ, Sauberan SL, Luke NR, Schultz LW & Umland TC (2009). Penicillin-Binding Protein 7/8 Contributes to the Survival of *Acinetobacter baumannii* *In Vitro* and *In Vivo*. *J. Infect. Dis.* **199**: 513-21.
- Sanders AN & Pavelka MS (2013). Phenotypic analysis of *Escherichia coli* mutants lacking L,D-transpeptidases. *Microbiology* **159**: 1842-1852.
- Santos RL, Zhang S, Tsolis RM, Kingsley RA, Garry Adams L & Bäumlér AJ (2001). Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes Infect.* **3**: 1335-1344.

- Sauvage E, Derouaux A, Fraipont C, Joris M, Herman R, Rocaboy M, Schloesser M, Dumas J, Kerff F, Nguyen-Disteche M & Charlier P (2014). Crystal Structure of Penicillin-Binding Protein 3 (PBP3) from *Escherichia coli*. *PLoS One* **9**: 1-11.
- Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA & Charlier P (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 234-58.
- Scheffers D-J & Pinho MG (2005). Bacterial Cell Wall Synthesis: New Insights from Localization Studies. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**: 585-607.
- Schmieger H (1972). Phage P22-Mutants with Increased or Decreased Transduction Abilities. *Mol. Gen. Genet.* **119**: 75-88.
- Schoonmaker MK, Bishai WR & Lamichhanea G (2014). Nonclassical Transpeptidases of *Mycobacterium tuberculosis* Alter Cell Size, Morphology, the Cytosolic Matrix, Protein Localization, Virulence, and Resistance to β -Lactams. *J. Bacteriol.* **196**: 1394-1402.
- Sha J, Fadl AA, Klimpel GR, Niesel DW, Popov VL & Chopra AK (2004). The Two Murein Lipoproteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Contribute to the Virulence of the Organism. *Infect. Immun.* **72**: 3987-4003.
- Shen S & Fang FC (2012). Integrated stress responses in *Salmonella*. *Int. J. Food Microbiol.* **152**: 75-81.
- Silhavy TJ, Kahne D & Walker S (2010). The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**: 1-16.
- Singh SK, SaiSree L, Amrutha RN & Reddy M (2012). Three redundant murein endopeptidases catalyse an essential cleavage step in peptidoglycan synthesis of *Escherichia coli* K12. *Mol. Microbiol.* **86**: 1036-51.
- Solano C, García B, Latasa C, Toledo-Arana A, Zorraquino V, Valle J, Casals J, Pedrosa E & Lasa I (2009). Genetic reductionist approach for dissecting individual roles of GGDEF proteins within the c-di-GMP signaling network in *Salmonella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**: 7997-8002.
- Soncini FC, García-Véscovi E, Solomon F & Groisman EA (1996). Molecular Basis of the Magnesium Deprivation Response in *Salmonella* Typhimurium: Identification of PhoP-Regulated Genes. *J. Bacteriol.* **178**: 5092-5099.
- Sorrell JM & Caplan AI (2009). Chapter 4: Fibroblasts-A Diverse Population at the Center of It All.
- Srikanth C V., Mercado-Lubo R, Hallstrom K & McCormick BA (2011). *Salmonella* effector proteins and host-cell responses. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**: 3687-3697.
- Stecher B, Paesold G, Kremer M, Jantsch J, Stallmach T, Heikenwalder M & Hardt WD (2006). Chronic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-Induced Colitis and Cholangitis in Streptomycin-Pretreated Nramp1^{+/+} Mice. *Infect. Immun.* **74**: 5047-5057.
- Sukhithasri V, Nisha N, Biswas L, Anil Kumar V & Biswas R (2013). Innate immune recognition of microbial cell wall components and microbial strategies to evade such recognitions. *Microbiol. Res.* **168**: 396-406.
- Sham L-T, Butler EK, D. LM, Kahne D, Bernhardt TG & Ruiz N (2014). MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis. *Science (80-)*. **345**: 220-2.
- Thompson LJ, Dunstan S j., Dolecek C, Perkins T, House D, Dougan G, Thi N, Thi T, La P, Cong D, Thi L, Tinh T, Farrar JJ, Monack D, Lynn DJ, Popper SJ & Falkow S (2009). Transcriptional response in the peripheral blood of patients infected with *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**: 22433-8.
- Thöne F, Schwanhäusser B, Becker D, Ballmaier M & Bumann D (2007). FACS-isolation of *Salmonella*-infected cells with defined bacterial load from mouse spleen. *J. Microbiol. Methods* **71**: 220-224.

- Tindall BJ, Grimont PAD, Garrity GM & Euzéby JP (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 521-4.
- Turner RD, Vollmer W & Foster SJ (2014). Different walls for rods and balls: the diversity of peptidoglycan. *Mol. Microbiol.* **91**: 862-874.
- Typas A, Banzhaf M., Gross CA & Vollmer W (2012). From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**: 123-36.
- Uchiya K, Barbieri MA, Funato K, Shah AH, Stahl PD & Groisman EA (1999). A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. *EMBO J.* **18**: 3924-3933.
- Uehara T, Dinh T & Bernhardt TG (2009). LytM-Domain Factors Are Required for Daughter Cell Separation and Rapid Ampicillin-Induced Lysis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **191**: 5094-5107.
- Uehara T & Park JT (2003). Identification of MpaA, an Amidase in *Escherichia coli* That Hydrolyzes the gamma-D-Glutamyl-meso-Diaminopimelate Bond in Murein Peptides. *J. Bacteriol.* **185**: 679-682.
- Uehara T & Park JT (2007). An Anhydro-N-Acetylmuramyl-L-Alanine Amidase with Broad Specificity Tethered to the Outer Membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **189**: 5634-5641.
- Uehara T & Park JT (2008). Growth of *Escherichia coli*: Significance of Peptidoglycan Degradation during Elongation and Septation. *J. Bacteriol.* **190**: 3914-3922.
- Uehara T, Parzych KR, Dinh T & Bernhardt TG (2010). Daughter cell separation is controlled by cytokinetic ring-activated cell wall hydrolysis. *EMBO J.* **29**: 1412-1422.
- Uzzau S, Figueroa-Bossi N, Rubino S & Bossi L (2001). Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 15264-9.
- Valdivia RH & Falkow S (1996). Bacterial genetics by flow cytometry: rapid isolation of *Salmonella* Typhimurium acid-inducible promoters by differential fluorescence induction. *Mol. Microbiol.* **22**: 367-378.
- Vats A, Singh AK, Mukherjee R, Chopra T, Ravindran MS, Mohanty D, Chatterji D, Reyrat JM & Gokhale RS (2012). Retrobiosynthetic Approach Delineates the Biosynthetic Pathway and the Structure of the Acyl Chain of Mycobacterial Glycopeptidolipids. *J. Biol. Chem.* **287**: 30677-30687.
- Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, P M, Ischiropoulos H & Fang FC (2000). Antimicrobial Actions of the NADPH Phagocyte Oxidase and Inducible Nitric Oxide Synthase in Experimental Salmonellosis. I. Effects on Microbial Killing by Activated Peritoneal Macrophages *In Vitro*. *J. Exp. Med.* **192**: 237-248.
- Vidal S, Gros P & Skamene E (1995). Natural resistance to infection with intracellular parasites: molecular genetics identifies Nramp1 as the Bcg/Ity/Lsh locus. *J. Leukoc. Biol.* **58**: 382-390.
- Vogel HJ & Bonner M (1956). Acetylornithinase of *Escherichia coli*: Partial Purification And Some Properties. *J. Biol. Chem.* **218**: 97-106.
- Vollmer W (2012). Bacterial growth does require peptidoglycan hydrolases. *Mol. Microbiol.* **86**: 1031-5.
- Vollmer W & Bertsche U (2008). Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**: 1714-34.
- Vollmer W, Blanot D & de Pedro MA (2008a). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 149-167.
- Vollmer W, Joris B, Charlier P & Foster S (2008b). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 259-286.

- Vötsch W & Templin MF (2000). Characterization of a beta-N-acetylglucosaminidase of *Escherichia coli* and elucidation of its role in muropeptide recycling and beta-lactamase induction. *J. Biol. Chem.* **275**: 39032-8.
- Watson KG & Holden DW (2010). Dynamics of growth and dissemination of *Salmonella in vivo*. *Cell. Microbiol.* **12**: 1389-1397.
- Wheeler R, Chevalier G, Eberl G & Gomperts Boneca I (2014). The biology of bacterial peptidoglycans and their impact on host immunity and physiology. *Cell. Microbiol.* **16**: 1014-23.
- Winfield MD & Groisman EA (2003). Role of Nonhost Environments in the Lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3687-3694.
- Woodhams KL, Chan JM, Lenz JD, Hackett KT & Dillard JP (2013). Peptidoglycan Fragment Release from *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* **81**: 3490-3498.
- Yang DC, Tan K, Joachimiak A & Bernhardt TG (2012). A conformational switch controls cell wall-remodelling enzymes required for bacterial cell division. *Mol. Microbiol.* **85**: 768-81.
- Zahr D, Wagner M, Bischof K, Bayer M, Zavec B, Beranek A, Ruckstuhl C, Zarfel GE & Koraimann G (2005). Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems. *Microbiology* **151**: 3455-3467.
- Zapun A, Contreras-Martel C & Vernet T (2008). Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 361-85.
- Zhao Y, Jansen R, Gaastra W, Arkesteijn G, van der Zeijst BAM & van Putten JPM (2002). Identification of Genes Affecting *Salmonella enterica* serovar Enteritidis Infection of Chicken Macrophages. *Infect. Immun.* **70**: 5319-5321.

ANEXO I

Tablas de estirpes, plásmidos y oligonucleótidos

Figuras suplementarias

Tabla A1. Estirpes de *S. Typhimurium* con distinto fondo genético empleadas en este trabajo

Estirpe	Genotipo	Referencia
SV5015	SL1344 His ⁺ , silvestre, virulenta	(Mariscotti & García-del Portillo, 2009)
14028s	Silvestre, virulenta	(Fields <i>et al.</i> , 1986)

Tabla A2. Estirpes de *E. coli* empleadas en este trabajo

Estirpe	Genotipo	Referencia
DH5 α	F ⁻ Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ ⁻	(Hanahan, 1983)
XL1-Blue	endA1 gyrA96 thi-1 recA1 hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺) supE44 relA1 lac[F' proAB lac ^R Δ M15 Tn10]	Startagene
BL21(DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(r _B ⁻ m _B) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene1 ind1 sam7 nin5])	(Studier <i>et al.</i> , 2009)

Tabla A3. Plásmidos empleados en este trabajo

Plásmido	Genotipo	Referencia
pKD4	Km ^R , Amp ^R	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD13	Km ^R , Amp ^R	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD46	γ , β , exo. Amp ^R	(Datsenko & Wanner, 2000)
pSUB11	Secuencia 3xFLAG, Km ^R	(Uzzau <i>et al.</i> , 2001)
pKO3Blue	pKO3::lacZ, Cm ^R	(Solano <i>et al.</i> , 2009)
pCP20	FLP ⁺ , Amp ^R , Cm ^R	(Cherepanov & Wackernagel, 1995)
pET-22b(+)	Amp ^R	Novagen
pET-24d(+)	Km ^R	Novagen

Tabla A4. Oligonucleótidos empleados para la delección de genes cromosómicos de *S. Typhimurium* SV5015 por el método de Datsenko y Wanner (*)

Nombre	Secuencia 5'→3'
KO-PBP 1A Fw	TTCCGATGCAGGTTTACAGCGCGGATGGCGAAGCTTATCGCGCAATATGGCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-PBP 1A Rv	GCCGTCATCCGCTAACACAATAAAAAAGGCGCCGGAGCGCCTTTTTTGAATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-PBP 1B Fw	GGAAGAATAGAGAATCGGGCCTTTGCGCCTGTATGTTGCGGAGAAAAAGCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-PBP 1B Rv	TAACGGTGTAGACCGGGTAAGCACAGCGCCACCCGGCACTATTACCGTGAATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-PBP 1C Fw	TAACTTTAAATTAATGAAATTCATAATTTATTCTGAAGAGTTGTTAACGCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-PBP 1C Rv	TGTGGCTGGCGGGCGCGCCGCTTTTTATTTTCTGGCGTTATGGGCAGCGATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-PBP 2*Fw	GGCGCTGACCGCCCCGATCATTAGCGCGCGGATTGTTTCAGGTACAGGTAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-PBP 2* Rv	ATGCAGATATCCGGCCGATCCTTGTCTGTATGGCGCTTTGCTTATTGAAATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-PBP 3* Fw	GGGCGCTAAAGGGCGCAAGTGAACGCGAATTGCGCCCCGGGAAAATCCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-PBP 3* Rv	CCGTTTCCCGTTAAATCAATCACCTGAAAATGATTCCGGCTGGAGATCAGATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-MtgA Fw	CGACACAGATCGCAGGCCGATAAGGCGTTTCGCGCCGCATTGACAAAAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-MtgA Rv	ATTAGTGTCCGCGTGTCTGGTCTGGCGGAATGAGCAAACGACGCATCGCATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-ErfK Fw	TACTAATACAGATACTCCAGCCCATGAAAACCAGCAATGCGACAGGATATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-ErfK Rv	GAAAAAAGCTATACTTAACGCACACCTGCCGCGACAAAAGGAAGGATATAATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-YbiS Fw	GCCGTAAGAGAAGCCCGATAGTATCTATCGGGCTTCGAGGCAGAGTCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-YbiS Rv	TGACAGAATTCTCAACCTACTAGCCTGCTTGGCACAGAATCTGCATAAACATTCCGGGGATCCGTCGACC

KO-YcfS Fw	AAAGCCTCGCGATGCATCGCGAGGCTTTTTTGTCCGGTCAGCTATTCACGCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-YcfS Rv	TATTTCTCTTTTATAAAAATAACCACATAATAATCATGGTTTATTATAATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-YcbB Fw	GCGGGCAGCGCAGTCATGCGGAGTATGATAACGAAAACAGGGGGCAAGGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-YcbB Rv	CCCCGTTGAAGCCAAACATTAGGACAACATATTTACCAGAACTTCTTCATATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-YnhG Fw	GCGTACCAGTCGTCGAGAGGGCATCACCAGGAATACAGGAGTTTGGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-YnhG Rv	AAATGGCGCACATCGTGCCCATTTTTTGTCCGTGTTTGTGCTGCAAAGGATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-YafK Fw	TAATCGTAGCCGGTTTTAGTGCGCCCAGAAATCTTTGTAATGAATAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-YafK Rv	CTCTTTTGCCGTTCTGGCGTGTGTAACCGTTTTATCAAGGAACAAGCAGTATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-STM3277 Fw	GTCATTCATCGTAAATGGGAAGATATGGACAGGCACGCTCTTCTGCCCGCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-STM3277 Rv	TCATAGGAAAATATACTTGAAGTGGTTTCAATAAGCGGAATACGAAAATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-PBP 4 Fw	GCGTTGCGCCGTAGTATGACGGCTTGTTCAGGGTGTAGCGCGAGATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-PBP 4 Rv	TAGGCCAGATAAGACGCGTTAGCGCCGCCATCCGGCAATAAATGCACTCAATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-PBP 5 Fw	ATGCATAGTATATGGGACGAAAATCACACTTTCAAGCGTTCAATTTTTAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-PBP 5 Rv	TATAGTAGGGCTCTTTTTTAAATTCATCACGGACGTCGTAGTTCAGACCATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-PBP 6 Fw	TTACACGGTGGTGTGACGTGTTTTTGGAATGGATACTCGGGTGGTACTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-PBP 6 Rv	TAACCGCCCGTAGCCGGATGCGACGCGCACCCGGCTACGGAGTTATTTTAATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-PBP 6b Fw	CCCTTTTGACACCTCAGATGACGGTGAACGGTGTGTGTGACAACGGCTTAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-PBP 6b Rv	TTAACTGAACCTCCGTA AAAAGAACGGCAAAATAGAGACCATCCTGAGGACATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-PBP 7 Fw	GCTCCGGCACTGGCGCTGGCTGCCGCCATTTGCGGGCTTTTTGCTTTTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-PBP 7 Rv	TCAGGCGGTGTGCGTTACGACGCGCGTGAATCATTATCAGAAATCTCATCATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-AmpH Fw	CCGGTACGTCCATCCCGATGATTTCTTAACTGTATGCGCTGATAAATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-AmpH Rv	GGTAGTATAAATACGCATAACCACCGTTATTTCACTTATGGACATCACCGATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-MepA Fw (&)	ATCGGGCACAGAATGCGGATGTAAGACAGAGATTCCACGCTGGTAAGAAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-MepA Rv (&)	CACCACCAGCAGCAGCGGGGAGACCATAAACAGATCATAAAAATTGTCCACATATGAATATCCTCCTTAGT
KO-YdhO Fw	GGTGGCGCAAAAAGAAGATTATCCTGTGCTTAAACGACAGGATAAAAATAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-YdhO Rv	CTGTGCTTTTGTAGATTAGAATTATCAGGTTTTGTAATCATACGCAGGCATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-Spr Fw	ATTTTTATAACGATATTTATCGTTAAGGACTTCAAGGGAAAACAACAACGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-Spr Rv	TTTTATGTCGTCTCATCAGGTAAGCCAAGGGAGGTGCTGCCTGATGAAGAATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-NipC Fw	AATTTGACGCTAAATTAATACCAAATAAAAACAGAGATTGTTGCGCGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-NipC Rv	AACCGGCGATATGTTAAAAATAGACTATAAAAATTTATATCGTCTGCGAGGATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-STM1940 Fw	CGCGCACGGTTGCCTTAATCATGTCTCCGCGATAACACAGTTTGTCAACGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-STM1940 Rv	AATGGCGGTTTTGGTCAGTCTCTATATATATGCTTTCCCGCTTTACGGAGATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-YibP Fw	GCGGATGACCGTGATCAACTCAAATCTATTACGGCCGATATCGCCGCGAAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-YibP Rv	AAACCTTGTGCGACCGTCGTATGGCCGTAAGGCGCTCAATCTGTCTTAGATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-MitA Fw	GTTACCGGCGCCCGGCGCGCTTTTTAACACCCAGACGCGACCATAGTGATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-MitA Rv	GGTTTGTATCTTACCGGGCACTTTTCGATTACGCGAAGACGAGACACCATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-MitB Fw	CAAAAAGCCATAATAATAGCGGAGGGGTGCTCCCCTCCCTAAGCGTAAAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-MitB Rv	GGATGCTTTACCATACTTCTCCCTGGCTGAATTTGTTAATGGATGTCTCATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-MitC Fw	GTCGCTGCCGGCAACATGGCATAACGACAACAACATGCACTCCCGGAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-MitC Rv	AACATTGCCAGATACGCTGTGCCGTATCGATATTGCTGGCGGGTTCGAAATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-MitD Fw	TAAAAGGCGCCGGGGGAAGCGGCGCCTTTTTGGCTTTTTCGTCGGACAATAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-MitD Rv	TAACCTCGCCGTTATGATCGGTGCTTTTTAAGCAACTATTGACACACACATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-EmtA Fw	CGAGGCCCGAGAAAGAGCGAATAAAGTGCAGAGAATAATCTTACGCTAAAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-EmtA Rv	GGCGGTATGACCTCTTCGGCAGATAAGTTACGGCTATAAGGATAGATGACATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-MitF Fw	AAAACATCTTTTACGCCCAGGCAACGCACGATCCAGAGAATTAATAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-MitF Rv	CGCAATGCCGATAAGACGTTGCGCGTCCGCATCCGATAAGACCATCGCGATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-Sit Fw	ATTCATTACGCGCATGATGCTGCATTGGATAACAATTGAGGAAGTGCTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC

KO-Slt Rv	GGCCTCTTTCTGCCCCATAAAGTGGCGATAGTAAGCGTCATAGGCCAGAAATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-STM4217 Fw (&)	GCGATCATCGTTGCGGCAATTTGCCCTGCCGTGCGCTGGGGCTGTAACGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-STM4217 Rv (&)	AGGGAGATGACTTCCCAAAAATCGATACTGAGTTTCATTACTCCCTCTGACATATGAATATCCTCCTTAGT
KO-AmiA Fw (&)	TACGCGATACGATATAACATCTTGAACCTAATTTTCACAACTCAGGCCGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-AmiA Rv (&)	CTGCAGGCGTAGCAGAACTGTTTTACGTGATGTGCATCGGGTTTCATGACATATGAATATCCTCCTTAGT
KO-AmiB Fw (&)	GGGTCAATCGTTACTGGCGCTTTAGCCGATTAGCTATAAAGGTGGCGGGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-AmiB Rv (&)	ATTTGGTTGCGAAGCTGCGGCGCAGAACCTGAATCGGCATGAAATCTCCCATATGAATATCCTCCTTAGT
KO-AmiC Fw	TGCGGGCAGCATCCTACTTACCCGCGCAATAAACTCGCCGTCATCTCAGGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-AmiC Rv	ATTTGGATGAACCTTTGTATGATCTCTATTTAGTTTTGCTCGGGAGAAGCATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-AmpD Fw (&)	AACATGCTACTCTGAAGCAGCTATAAGCACCCTCAAAGGAGACTCCGCGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-AmpD Rv (&)	AGGCGCTCGACAATCAGCACCAGTAATGTCGTAACAGCGTCATGTCATCATATGAATATCCTCCTTAGT
KO-NagZ Fw (&)	GGCCGATGAAACCTGGCGCCAGCTACGTATGAAAGGATAAGGAGAGCAGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-NagZ Rv (&)	TCAAACCGTGTAAATAAATAATCATCTGGCACCCCTCACGAAAACCTCGAGCATATGAATATCCTCCTTAGT
KO-LdcA Fw	TATATGCGGCATGATATACATTTGCATTCTATTGTCAGCAAGGAATTACC GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-LdcA Rv	AATTGCAGCGTAGGATGGCCAGATAAAGTGAGTTGAGTCCCCTGGCGCGTATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-Mpl Fw	GCCAGACATGTGCGTAAATGGCTCGCAGATAAAAAAGGATAGTGACGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-Mpl Rv	ATGCCCCATATAAACAGCCAGCCACAAGGCTGGCTGACCGCATAGTCATATTCCGGGGATCCGTCGACC
KO-Ycjl Fw	ACACAACACTACGATGATTACCCTACTGGTCTCAGCTTCGGGAAACGCGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KO-Ycjl Rv	GCTTCATCGGCGGAAACAGGGGAAACTCGGCGTAATGCAGTGCAGGTTATTCCGGGGATCCGTCGACC

(*) En color se muestra la secuencia complementaria a la secuencia presente en el plásmido utilizado en el método de Datsenko y Wanner (Datsenko & Wanner, 2000).

(&) Oligonucleótidos diseñados para la interrupción del gen mediante el plásmido pKD4, el resto se emplearon con el vector pKD13.

Tabla A5. Oligonucleótidos empleados para la confirmación de construcciones genéticas implicando delección o etiquetado de genes cromosómicos de *S. Typhimurium* SV5015

Nombre	Secuencia 5'→3'	Gen
FL-1A-Fw	AGCCATAACGGTCGATCTCC	<i>mrcA</i>
FL-1A-Rv	AGGGCCGAATTGCCTGATGG	<i>mrcA</i>
FL-1B-Fw	TCGTGACGTGTTATACGTTGCCCTC	<i>mrcB</i>
FL-1B-Rv	GACGTAAGCGTCTTATTCGGCCTA	<i>mrcB</i>
FL-PBP 1C Fw	TTATGCGCTGGTCTCTTGATATT	<i>pbpC</i>
FL-PBP 1C Rv	GTTGGCGTGGTAAACGTGG	<i>pbpC</i>
FL- PBP 1C Fw (2)	AAAGTGGCGGCGAGAAATAG	<i>pbpC</i>
FL- PBP 1C Rv (2)	AACCGCAGGTGGAATCGAT	<i>pbpC</i>
FL-2* Fw	AGGCCTGACTCCGGATAACGGA	<i>STM1910</i>
FL-2* Rv	ACCTCTATGCCTTACGGGCAG	<i>STM1910</i>
FL-2* Fw (2)	AGATGGAACATCTTTTACCTGTGCT	<i>STM1910</i>
FL-2* Rv (2)	GTTGACCTCTATGCCTTACGGG	<i>STM1910</i>
FL-2* Fw (3)	AGAATGACGCGGTTGCAATAGC	<i>STM1910</i>
FL-2* Rv (3)	CGCTATGTCGAACGGCACTATGC	<i>STM1910</i>
STM1910 Fw	CTGACTCCGGATAACGGACTCAGG	<i>STM1910</i>
STM1910 Rv	TATCTCGCCGGAAGGTGAACTGC	<i>STM1910</i>
FL-3* Fw	TGGCGCTGTGGACATATAACG	<i>STM1836</i>
FL-3* Rv	GCCTCAGATATAAAGCCTCGCT	<i>STM1910</i>
STM1836 Fw	TGCGTAAGCGGCTGATGGCA	<i>STM1910</i>
STM1836 Rv	GCGATACCCGTAATTTTACGCCCA	<i>STM1910</i>

FL-YcbB Fw	CAGCGCAGTCATGCGGAGTA	<i>ycbB</i>
FL-YcbB Rv	ACGAAAGGCACCTTAAGTCCGA	<i>ycbB</i>
FL-PBP 4 Fw	GGAGTCCCTATGGGTACATCG	<i>dacB</i>
FL-PBP 4 Rv	GCTTACGCTTATCCGGCCTAC	<i>dacB</i>
FL-PBP 4 Fw (2)	GTTTCGGTGCAGCATGATAC	<i>dacB</i>
FL-PBP 4 Rv (2)	GCAGGCTGAAGAAGCAAACA	<i>dacB</i>
FL-PBP 5 Fw	TGGTTTTTCATGTCAGCTCCG	<i>dacA</i>
FL-PBP 5 Rv	AAGTCAGATGCCTGCCAGTTATG	<i>dacA</i>
FL-6 Fw	TCTTTAACGTCGTGAGTGCGT	<i>dacC</i>
FL-6 Rv	CAGTAAATTCGGCAAGGTACG	<i>dacC</i>
FL-6b Fw	TACGGTCACAAGGACAGCGTGA	<i>dacD</i>
FL-6b Rv	TCCGTAGCATGGTTGACGGCT	<i>dacD</i>
FL-7 Fw	CGACTTAATCGTTCTGTGCGGT	<i>pbpG</i>
FL-7 Rv	TGATCCTGTGGGATACGGCT	<i>pbpG</i>
FL-7 Fw (2)	TCCATGCGCTGAAAGCGCAAATGC	<i>pbpG</i>
FL-7 Rv (2)	TCCTGGAGGTGCTACTGGCGATCAC	<i>pbpG</i>
FL-AmpH Fw	TGATCAGTATTAACCGTTTGCC	<i>ampH</i>
FL-AmpH Rv	TCCATCACGAAAACCCGC	<i>ampH</i>
FL-YdhO Fw	GTGCGCGTAAGGATAGGGTA	<i>ydhO</i>
FL-YdhO Rv	CGCGTTCGTGTTTAGCATT	<i>ydhO</i>
FL-STM1940 Fw	TGTCTCCCGGATAACACAG	<i>STM1940</i>
FL-STM1940 Rv	GTGATCCGCATCATGCTTTA	<i>STM1940</i>
FL-MitA Rv	TGCGGACCAGACGACAGATA	<i>mitA</i>
FL-MitB Fw	TTTGAACCGTATGACGGCG	<i>mitB</i>
FL-MitB Rv	GAAGAATACCTGTCACCATACCGG	<i>mitB</i>
FL-NupG Fw	GAACGATAAGATTTCAGGCCGC	<i>nupG</i>
FL-NupG Rv	AACCCACAGGATGCCAACAG	<i>nupG</i>
FL-MitD Fw	GAGTTGCAGGATGACGGTTC	<i>mitD</i>
FL-MitD Rv	CATTGCTAACTTCGCCGTT	<i>mitD</i>
FL-EmtA Fw	TCCATCAGCGAGCGTAAGGT	<i>emtA</i>
FL-EmtA Rv	GTCCGTACCGGCAAACG	<i>emtA</i>
FL-Slt Fw	GCATGATGCTGCATTGGATA	<i>slt</i>
FL-Slt Rv	AGCCGATGAATAAGGGGAAT	<i>slt</i>
FL-AmiA Fw	TCTCATCACCAACCGTCGTA	<i>amiA</i>
FL-AmiA Rv	CGCCAGCTATCTTCGACAA	<i>amiA</i>
FL-AmiB Fw	GCAACAAGGTAAGGGCGTTC	<i>amiB</i>
FL-AmiB Rv	ACCTGAATCGGCATGAAATC	<i>amiB</i>
FL-AmiC Fw	GCGGAGTATAGTGCGCATCC	<i>amiC</i>
FL-AmiC Rv	CTGTTTTTGCCCTCTGTGCA	<i>AmiC</i>

Tabla A6. Oligonucleótidos empleados en el análisis de un posible efecto polar en genes adyacentes ligado a deleciones de genes cromosómicos de *S. Typhimurium* SV5015, así como para la confirmación de construcciones genéticas implicando deleción o etiquetado

Nombre	Secuencia 5'→3'	Gen delecionado o etiquetado
YrfD Fw	AAGTCGCATGGCTTTACAAA	<i>mrcA</i>
YrfD Rv	GATTTACGTCCCCACGCATAG	<i>mrcA</i>

NudE Fw	GCGTCGCGTGTATGAACGTA	<i>mrcA</i>
NudE Rv	CTCCGGATAGAGATCTTCCGC	<i>mrcA</i>
HrpB Fw	GCGCTATCAGTTAGCCAATGG	<i>mrcB</i>
HrpB Rv	AAGCTCCTCTTCAGACGGCTT	<i>mrcB</i>
FhuA Fw	ACCTATCGAAAAACGCCACA	<i>mrcB</i>
FhuA Rv	ACCGTAGAGGACGGACGTTG	<i>mrcB</i>
STM2530 Fw	GCACGTCGCCTGTTGAATCT	<i>pbpC</i>
STM2530 Rv	TCAAACCGATAGCGTAACGC	<i>pbpC</i>
STM2532 Fw	TGGACAGCGGACGATTTTG	<i>pbpC</i>
STM2532 Rv	CATTGGTATACAGCGCCGG	<i>pbpC</i>
ArgS Fw	TTGGTCATCTACGCTCCACG	<i>STM1910</i>
ArgS Rv	TTACGCCACATCTCACGGAA	<i>STM1910</i>
STM1911 Fw	AGGATGAAAGCGGTTTGTGG	<i>STM1910</i>
STM1911 Rv	TCCGTCAAACACAGCATTGC	<i>STM1910</i>
RrmA Fw	CCACGTTTGGACTGGACGTT	<i>STM1836</i>
RrmA Rv	TGCAATGTGAATCCGTCGAG	<i>STM1836</i>
CspC Fw	GTGGTTCAACGAATCCAAAGG	<i>STM1836</i>
CspC Rv	TTTTGAAACCATTGCCCTGG	<i>STM1836</i>
YrbL Fw	GATTACCGATTTCAACGGCG	<i>mtgA</i>
YrbL Rv	CGATAAACCGCTGCCACAC	<i>mtgA</i>
YhbL Fw	GCGGCGAAGAACCTGAGTAA	<i>mtgA</i>
YhbL Rv	ATCCTGCGCCAGCATATAGG	<i>mtgA</i>
YeeO Fw	GCTAAAGGCGACCACCACCGTA	<i>erfK</i>
YeeO Rv	GGTATGCCAAACGCAAGAGCTA	<i>erfK</i>
CobT Fw	GGCTTCCACGATCGGCATCG	<i>erfK</i>
CobT Rv	ATGACCGGCGTGATGCTTGG	<i>erfK</i>
YbiR Fw	TTGGCGCACTGTCTCACCTG	<i>ybiS</i>
YbiR Rv	GCCGATATTCACCGCCACG	<i>ybiS</i>
YbiT Fw	GCAACCGTTACGGCCTGATCG	<i>ybiS</i>
YbiT Rv	GCTCATTTCCGGCAAGGCGTA	<i>ybiS</i>
YcfR Fw	CGCCGTTGAAGTTCAGGCAACG	<i>ycfS</i>
YcfR Rv	GGTATTCCGGCCGGTAACAG	<i>ycfS</i>
Mfd Fw	CGAGCTTTTGCCTGTTGG	<i>ycfS</i>
Mfd Rv	AAACGCCGTTGATGCGCTGAA	<i>ycfS</i>
MukB Fw	GAGCAGGTTGTGACCGGAA	<i>ycbB</i>
MukB Rv	TCGGATCTTCCGACAGACGCAA	<i>ycbB</i>
YcbK Fw	TAATCGCCGCAAGCTGCTGG	<i>ycbB</i>
YcbK Rv	TTATTCGCGCGATAGTCACGGA	<i>ycbB</i>
YnhA Fw	CCAACGGCATTATCGAATTGCA	<i>ynhG</i>
YnhA Rv	CTAAGAGTGGCGCCTTAGC	<i>ynhG</i>
LppB Fw	GTTGTCCAGACGTTGGTTCCG	<i>ynhG</i>
LppB Rv	GTCTTCCGATGTACAGACGCTGAG	<i>ynhG</i>
YafJ Fw	AGCGTTTTGCTGGCTATTGCA	<i>yafK</i>
YafJ Rv	CCACGTCATTTGGCGTGGTCTG	<i>yafK</i>
DinP Fw	TGATAATCCGGCGTTACGCGA	<i>yafK</i>
DinP Rv	CTTTATAGGCGTCAAAGCGCCA	<i>yafK</i>
YhbW Fw	AGCAGGCTTTCGTGAAGCTACG	<i>STM3277</i>

YhbW Rv	TTTCATCCGCCTGGGTCTCC	<i>STM3277</i>
STM3278 Fw	GTTGCCATGGTTTACTGAGGAGCA	<i>STM3277</i>
STM3278 Rv	CGATCTCCGAACCCCACCAGTA	<i>STM3277</i>
GreA Fw	ACGCGGAGTATCATGCTGC	<i>dacB</i>
GreA Rv	CCAGGCGTTTTGATCACCAC	<i>dacB</i>
ObgE Fw	GTTTCATTCGTGCGGTATCGG	<i>dacB</i>
ObgE Rv	CGCCAGATCCTGGCTGTATT	<i>dacB</i>
ObgE Fw(2)	CGGTAATGGCTGTGTGAGCTT	<i>dacB</i>
ObgE Rv (2)	CAACAGACGCTGACCGTGTTT	<i>dacB</i>
RlpA Fw	GTAATTTAACCGCCTCCGGG	<i>dacA</i>
RlpA Rv	TAGGTCTGTTTCGCCACCGT	<i>dacA</i>
YbeD Fw	GCTTGAATTCCTACGCCATT	<i>dacA</i>
YbeD Rv	TCGTACAGCGTTTCAACCTGTT	<i>dacA</i>
DeoR Fw	CGCAGCGCCAGTCATTATCT	<i>dacC</i>
DeoR Rv	ACGTTTCATGAAATCAAGCG	<i>dacC</i>
YliJ Fw	AATTCGGCGTTAACCCAGGATG	<i>dacC</i>
YliJ Rv	TCGATACCGGCTTCAATTGC	<i>dacC</i>
SbmC Fw	ACACCGTGAAGCAGGTTTT	<i>dacD</i>
SbmC Rv	TGATAAGCGCTATCCTGCTCG	<i>dacD</i>
PhsC Fw	GGTGCTGCTCATGCTTGTG	<i>dacD</i>
PhsC Rv	CCGATAGTGACGCCCGTTAC	<i>dacD</i>
Did Fw	GGTCTGACGGAAGGCTCCA	<i>pbpG</i>
Did Rv	CAATACGGGCAAAGAGCGAC	<i>pbpG</i>
YohC Fw	GATCGGGAAATGCAGGTGAT	<i>pbpG</i>
YohC Rv	AGCCGGCAAAAACCATACAG	<i>pbpG</i>
SbmA Fw	CGATACTGGCACCTCGCTC	<i>ampH</i>
SbmA Rv	GCCCCCTTCGATATGGCGTA	<i>ampH</i>
YaiV Fw	GAGAGCGGTTGCATCGGTTA	<i>ampH</i>
YaiV Rv	AATTACCCTTACGCAGGGCC	<i>ampH</i>
YfcA Fw	TTTGTGCCGCTACTGGCAG	<i>mepA</i>
YfcA Rv	TGAAAATCACCAGGATGGGC	<i>mepA</i>
YfcA Fw 2	ACGACGGCTTTTTCGGG	<i>mepA</i>
YfcA Rv 2	CATAAAGTAACCTGGCGCTCATTAC	<i>mepA</i>
AroC Fw	CGAACCGGTATTTGACCGAC	<i>mepA</i>
AroC Rv	GCGCCCTTTGGTGATCATT	<i>mepA</i>
AroC Fw 2	AATTGGACAACCTTTTCGCGTAA	<i>mepA</i>
AroC Rv 2	TCCCGGACGAAAAACATCTT	<i>mepA</i>
SodB Fw	TGCCATCAGCGCTTTTTACC	<i>ydhO</i>
SodB Rv	GGCAAATCGCTGGAAGAGATC	<i>ydhO</i>
YdhD Fw	TCGCTGAAAACCCGATTCTC	<i>ydhO</i>
YdhD Rv	GCCGTCCACCCACAGTTG	<i>ydhO</i>
YeiU Fw	CCGCCTTTATGCTGCGTTAT	<i>spr</i>
YeiU Rv	CAGGGGAGGCCAATCAAAT	<i>spr</i>
Rtn Fw	TTTAGCCTTAATGTCCGCGC	<i>spr</i>
Rtn Rv	GTGAATACGCCGCTGTCATT	<i>spr</i>
BtuD Fw	CCTTGCTGCCGTTGTACTAC	<i>nlpC</i>
BtuD Rv	TGTGGTTCAGATCGTGGCTA	<i>nlpC</i>

YdiV Fw	GAAAACGCTCGGCTTGTT	<i>nlpC</i>
YdiV Rv	AAGTCACTAATTGCAGGCGG	<i>nlpC</i>
STM1939 Fw	TTCGTCTACCGCTTCTCTGTCA	<i>STM1940</i>
STM1939 Rv	GAACCGCAACCGCTATACACA	<i>STM1940</i>
STM1941 FW	CAATACATACTGTAGCGCGTCAGTT	<i>STM1940</i>
STM1941 Rv	TGAGCCTGAGAGTGCAATCG	<i>STM1940</i>
Pmgl Fw	ACTTATGACCTGCAACCGGA	<i>yibP/yigQ</i>
Pmgl Rv	CAGTTATCCAGCGCTTCCAC	<i>yibP/yigQ</i>
YibD Fw	GGAATAGATTGCCAGGCGTG	<i>yibP/yigQ</i>
YibD Rv	TACCCACATGTTCCGACTGCT	<i>yibP/yigQ</i>
YgdL Fw	GCGTCTGTACGGTGAAAAAGC	<i>mitA</i>
YgdL Rv	ATAACCCGCCACATTATCCG	<i>mitA</i>
SrlA Fw	ATTCCAGAAAGGCGGAGAGG	<i>mitB</i>
SrlA Rv	CGGAAACAGACCGTTCATGG	<i>mitB</i>
YgaD Fw	AACTGATGCGGCTTAGCGAG	<i>mitB</i>
YgaD Rv	ATCCCGCTAATAGCGACAGC	<i>mitB</i>
NupG Fw	CGCATCTATTGGCGCAGTTT	<i>mitC</i>
NupG Rv	GATACGGATAGGCGGGAAGTC	<i>mitC</i>
YggX Fw	GACGCTGAAGGGCAAGATTT	<i>mitC</i>
YggX Rv	GTCTTTGCCTTCGAACAGGAA	<i>mitC</i>
SpeC Fw	TGCGTGAGCTATGTCAGGAGA	<i>nupG</i>
SpeC Rv	GGCAACAGATTGATGCCCTC	<i>nupG</i>
YafE Fw	CATGGATGTCATGTCGCCTG	<i>mitD</i>
YafE Rv	CGCTGCTAAACGAACCGTC	<i>mitD</i>
GloB Fw	GGCACGCCATCACAGATGTA	<i>mitD</i>
GloB Rv	AACGCGCTTCTGGTTGTTG	<i>mitD</i>
YcgR Fw	CCGGAAAACTCATCGTGGA	<i>emtA</i>
YcgR Rv	GGGAAAGATCAAACAGGCGA	<i>emtA</i>
STM2566 Fw	CCGACGAAACCGTTTGCGTA	<i>mitF</i>
STM2566 Rv	CTGGATCGTGCGTTGCCCTCG	<i>mitF</i>
YfhC Fw	GGCTATGCACCATAGCGCCTG	<i>mitF</i>
YfhC Rv	AGATCACGAATACTGGATGCGCCA	<i>mitF</i>
TrpR Fw	GGCTATCGCCGAACAACGTA	<i>slt</i>
TrpR Rv	CCCAGCTCGGTTTTCAACTC	<i>slt</i>
YjjK Fw	TTCCGCCGAAACGTCATATT	<i>slt</i>
YjjK Rv	GGTTTAGCTGAGGTTCTCGCG	<i>slt</i>
STM4215 Fw	TACTGCGGTTCCGTTTTTGC	<i>STM4216-4218</i>
STM4215 Rv	AGGGTGCTGGCGGTCATAT	<i>STM4216-4218</i>
STM4219 Fw	GCGTCGCAGGTGCTTATTG	<i>STM4216-4218</i>
STM4219 Rv	TGGACCCGCTTAACGATTTT	<i>STM4216-4218</i>
STM2449 Fw	TTTTGCCAGGAAGATTTTCG	<i>amiA</i>
STM2449 Rv	AATTTGGATTTTCGGACACCC	<i>amiA</i>
HemF Fw	CAGTTTCTGCTACGCCTGCA	<i>amiA</i>
HemF Rv	GCACGTTAGCATGGCTGGT	<i>amiA</i>
YjeE Fw	TGGCGCGACCGTTATTTATC	<i>amiB</i>
YjeE Rv	GCGCCTGGTAATCAATATGGA	<i>amiB</i>
MutL Fw	CAGCTTGGCAACCAATCG	<i>amiB</i>

MutL Rv	TTAGCGTCAAACGCGAGACC	<i>amiB</i>
ArgA Fw	AGCCTCGGTATTCGCCTTGT	<i>amiC</i>
ArgA Rv	GGATACGGCCGCTATGACAG	<i>amiC</i>
NadC Fw	CGGCTGCGTGAAGATTTAGG	<i>ampD</i>
NadC Rv	CGGAAAGGTCTGGACAAAGT	<i>ampD</i>
AmpE Fw	TATTCGTCGGATTACGCATT	<i>ampD</i>
AmpE Rv	TCACGC AAAAATTCACGCTC	<i>ampD</i>
ThiK Fw	CGCCTTTGCATATGGATGT	<i>nagZ</i>
ThiK Rv	TCGGCCAGCCTGATAAATTG	<i>nagZ</i>
YcfP Fw	ATTC AAATAGTCCGGGCAACC	<i>nagZ</i>
YcfP Rv	GCATATTCTTCGGGCGAT	<i>nagZ</i>
YcgO Fw	TTCTGGTCATTTTCCTCGCC	<i>ldcA</i>
YcgO Rv	CGGTCAGTGAACCGACTATC	<i>ldcA</i>
Fbp Fw	CGTCGATGTTAGAAGGCCATCC	<i>mpl</i>
Fbp Rv	TGAGCTCACTGCTTTGCTGTCG	<i>mpl</i>
STM4417 Fw	GCTATGACAGCCTTAGCAAACGTC	<i>mpl</i>
STM4417 Rv	GGCTTTTCCGGGGTAGGTTCC	<i>mpl</i>
MppA Fw	GCATCATCCCGCAACGTAA	<i>ycjI</i>
MppA Rv	TGGCATATGCTGCGGATGT	<i>ycjI</i>
YcjG Fw	GCCGGTTTTATCCAGCTTAATGT	<i>ycjI</i>
YcjG Rv	GGAGGCGACGCTCATTGT	<i>ycjI</i>

Tabla A7. Oligonucleótidos empleados para el etiquetado de genes cromosómicos de *S. Typhimurium* SV5015 (*)

Nombre	Secuencia 5'→3'
FLAG-MrcA Fw	ACCATTATTGATAATGGTGAAACACACGAACGTTTCGACTACAAAGACCATGACGG
FLAG-MrcA Rv	GCTAAACACAATAAAAAAGGCGCCGGAGCGCCTTTTTTGCATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-MrcB Fw	GTTGCCGGCTGGATTAAGGAGATGTTCCGGCGGAATGACTACAAAGACCATGACGG
FLAG-MrcB Rv	GACCGGGTAAGCACAGCGCCACCCGGCACTATTACCGTGACATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-PBP 1C Fw	TAATGGATGAGTCCGGTCAGGTTGCAGCGGTAATTTTGAATTAACGTGACTACAAAGACCATGACGG
FLAG-PBP 1C Rv	TCTCATTAACTTTAAATTAATGAAATTCATAATTTATTCTGAAGAGTTGCATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-PBP 2*-Fw	TGATCCACAGGCTGATACCACACAGCCGATCAGGCGCCAAGACTACAAAGACCATGACGG
FLAG-PBP 2*-Rv	TCCGGCCGTATCCTTGTCTGATGGCGCTTTGCTTATTTGCATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-PBP 3*-Fw	TCTGGTGATGCATGGCAGCCACGTTGCGGTTCCGGGTTCCGACTACAAAGACCATGACGG
FLAG-PBP 3*-Rv	GGGCGCAAGTGTAAACGCGAATTGCGCCCCGGGAAATCCTCATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-MtgA Fw	AGATGCGCCAACCTGGGTGGGAATCTTTTATGACGCGCAACCAGCTTAATGACTACAAAGACCATGACGG
FLAG-MtgA Rv	CGACACAGATCGCAGGCCGGATAAGGCGTTCGCGCCGCCATTGCACAAAACATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-ErfK Fw	AGCGCCGTTCCGGAATGCCGGTCAACATTAGCGCGGGCAGGCTGGCCTTGACTACAAAGACCATGACGG
FLAG-ErfK Rv	TACTAATACAGATACTCCAGCCCATGAAAACAGCAATGCGACAGGATATCATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-YbiS Fw	TCGTACAACAGGCAGTTCAGGATCGTTCGGGATGCCGGTTCGTCTGAACGACTACAAAGACCATGACGG
FLAG-YbiS Rv	GCCGTAAGAGAAGCCCGATAGTATCTATCGGGCTTCGACAGCAGAGTCTGCATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-YcfS Fw	GAATGCCAGTGGATGTAACCCGTCAAGCAGAGGGCAAACCGCAGTCGCTGACTACAAAGACCATGACGG
FLAG-YcfS Rv	AAAGCCTCGCGATGCATCGCGAGGCTTTTTTGTCCGGTCAGCTATTCACGCCATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-YcbB Fw	CAGCGGATCCAGCGCACAAATTTGTCGCAAGGTTGAACAATTAATCAGGGACTACAAAGACCATGACGG
FLAG-YcbB Rv	CCCCGTTGAAGCCAAACATTAGGACAACATATTTACCAGAACTTCTTCATCATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-YnhG Fw	CCGCTCAGAAGGTTTTGTCCGGGAAGAGGGCAAACGCGCGCAGCAGGACTACAAAGACCATGACGG
FLAG-YnhG Rv	AAATGGCGCACATCGTGCGCCATTTTTTGTCCGTCGTTTGTGCAAAGGCATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-PBP 4 Fw	CGCTGGTACGCTTCGAGAGTCGGTTGTATAAGGATATTTATCAGAATAACGACTACAAAGACCATGACGG
FLAG-PBP 4 Rv	TTGTAGGCCAGATAAGACGCGTTAGCGCCGCCATCCGGCAATAAATGCACCATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-PBP 5 Fw	TCGGTAAAATCATTGATTACATTAATTAATGTTCCATCACTGGTTTGAAGACTACAAAGACCATGACGG
FLAG-PBP 5 Rv	CTGATGCATAGTATATGGGGACGAAAATCACACTTTCAAGCGTTCAATTTTCATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-PBP 6 Fw	GCTGATGAAACTCCATCAGTGGTTTTGGCAGTTGTTCTCGGACTACAAAGACCATGACGG

FLAG-PBP 6 Rv	CCGTAGCCGGATGCGACGCGCACCCGGCTACGGAGTTATTCATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-PBP 6b Fw	TATGTTCTCTCGTCTGAGCGACTATTTTCAGCATAAAGCGGACTACAAAGACCATGACGG
FLAG-PBP 6b Rv	GACACCTCAGATGACGGTGAACGGTGTGTGTGACAACGGCCATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-PBP 7 Fw	AGCCAGCGCCAGTGCCGGAGCGCAAACCGCACAGAACGATGACTACAAAGACCATGACGG
FLAG-PBP 7 Rv	TGAAGCCCGGCGGCGCGATGCCTGCCGGCCTGCGGCGACCATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-AmpH Fw	ATTTGTTACTGAGCTAAGCGGAATAAACCGATTGCTATTCCTGCATCCGACTACAAAGACCATGACGG
FLAG-AmpH Rv	TATTAACAAAAATGTTGCGCCTCGTCTGATATAGCGGAGGCGCGACGACCATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-MepA Fw (1) ⁽⁸⁾	TTACTATTTATCGTCGCATCTTTGTAGTCGATATCATGATCTTTATAATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTCGAGTACATGCTCATCCAGTA
FLAG-MepA Fw (2) ⁽⁸⁾	CGCGGATCCGCGATAACAGCAGGCCGCCAACG
FLAG-MepA Rv (1) ⁽⁸⁾	CGCGGATCCGCGGTCATGTTTATCCAGCGTT
FLAG-MepA Rv (2) ⁽⁸⁾	GACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGATATCGACTACAAAGATGACGACGATAAATAGTAATGGACAATTTTATGATCTG
FLAG-YdhO Fw	AACGTCAATTATGTCGGCGCCCGCGGGTGATGACGCCTAAAACAATTCGCGACTACAAAGACCATGACGG
FLAG-YdhO Rv	GGTGGCGCAAAAGAAGAAGTTATCCTGTGCTTAAACGACAGGATAAAATACATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-Spr Fw	CGTACTGGAAAAACGCTACAATGAAGCGCGTCGAGTTCTGAGCCGAGTGACTACAAAGACCATGACGG
FLAG-Spr Rv	TTTTATGTCGTCTCATCAGGTAAGCCAAGGGAGGTGCTGCCTGATGAAGACATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-NlpC Fw	CGCTGGATAATGTGTAAGGCAAAAACTTCTGGCAGGCACGGCGAATTGACTACAAAGACCATGACGG
FLAG-NlpC Rv	AACCGGCGATATGTTAAAAATAGACTATAAAATTTATATCGTCTGCGAGGCATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-STM1940 Fw	AGCTGATATCACTGGCTGGTAAGGTTCTGTTTAAAGCTTGGTTATATAGAAACTACAAAGACCATGACGG
FLAG-STM1940 Rv	CGCGCACGGTTGCCCTAATCATGTCTTCCGCGATAACACAGTTTGTCAACCATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-MitA Fw	GCGTCTGGGTGTTAAAAAGCGCGCCGGGCGCGGTAACGTGTTAGCGGCAGACTACAAAGACCATGACGG
FLAG-MitA Rv	CCGATAGCGATCGGTTATCGGGCAATCCGGTTGTCGCAGAATACCACAAACATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-MitB Fw	CGATGGCGGTTTGGCAACTGGGCCAGGCGGTAGCGCTGGCGGGTGCGCGACTACAAAGACCATGACGG
FLAG-MitB Rv	CAAAAAGCCATAATAATAGCGGAGGGGGTGTCCCTCCCTAAGCGTAAAACATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-MitC Fw	GCCGCTATCTGTATAAGGTGAATTCGCCCCAGCGATCGTATCGCCGCGGACTACAAAGACCATGACGG
FLAG-MitC Rv	TTACCTTTCCCGCCTCTGTCAATTTGCCAACAGAGGCGGGATGCGATGGTACATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-MitD Fw	CGGGCGATCAGCTTACGTTGTTGTGAAGGACAATAGCACGCCAGACTCCGACTACAAAGACCATGACGG
FLAG-MitD Rv	TAAAAGCGCCGGGGAAGCGGCGCCTTTTGGCTTTTTCGTCGGACAATACATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-EmtA Fw	CGCAGGCGCCGCGCTATATCTGGAAGCTTCCAGCAGGCGCTGGACGCCATGACTACAAAGACCATGACGG
FLAG-EmtA Rv	CGAGGCCCGAGAAAAGCGGAATAAAGTGCAGAAATATCTCACGCTAAAACATATGAATATCCTCCTTAG

FLAG-MitF Fw	TGACGCATTCGCCGCTTTACTGTTTACGCCGAGAAAGAAAGAAAAAGACTACAAGACCATGACGG
FLAG-MitF Rv	CGCAATGCCGGATAAGACGTTGCGCGTCGCCATCCGATAAGACCATCGCGCATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-Sit Fw	TGGGGCAGAAAGAGGCCTTAATGAGCGACTCTGAGTGGCAGCGACGGTATGACTACAAGACCATGACGG
FLAG-Sit Rv	CGCCGTTTGTACTGTTACACGAGTACAAATGATAACATAACCCGCTGCAATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-STM4217 Fw (1) (&)	TTACTATTTATCGTCGCATCTTTGTAGTCGATATCATGATCTTTATAATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTCATGAATGCAGCTAGCCTGCC
FLAG-STM4217 Fw (2) (&)	CGCGGATCCGCGCTGTCTGTTGGGATATATA
FLAG-STM4217 Rv (1) (&)	CGCGGATCCGCGCTTATCAATACGTATGCCT
FLAG-STM4217 Rv (2) (&)	GACTACAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGATATCGACTACAAGATGACGACGATAAATAGTAATCAGAGGGAGTAATGAAACT
FLAG-AmiC Fw	CGGGCATTAAAGCGTATTTTGGCGATGGGGCGACGCTGGCGAGAAGAAGTACTACAAGACCATGACGG
FLAG-AmiC Rv	TGCGGGCAGCATCCTACTTACCCGCGCAATAAACTCGCCGTCATCTCAGGCATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-AmpE Fw	TTGTGGTGGTGGTATTATTGCGTTGCTCACCATTATGGGGCATTAGTGACTACAAGACCATGACGG
FLAG-AmpE Rv	CAGATTTTCCATTGTAGGCAGCATAAGCGTTAGCGCCATCGGCACAACGCATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-NagZ Fw	CCCAGCTCAACCAGTTACATGAACGCTGGCAGGAAGAAAAAGCAGGTCATGACTACAAGACCATGACGG
FLAG-NagZ Rv	TCAAACCGTGTAATAAATAATCATCTGGCACCCCTCACGAAAACCTCGAGCATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-LdcA Fw	CGCGCCAGGGGACTCAACTCACTTTATCTGGCCATCCTACGCTGCAATTGGACTACAAGACCATGACGG
FLAG-LdcA Rv	ACATAATAACGGCCAGGGCAGCGTTTTACTTAGCCTGTGCGGGACTTTTTTATATGAATATCCTCCTTAG
FLAG-Mpl Fw	AGAAATTGCTGGATGGGCTGGCGAAAAAGCTCAGAACGTAACAGCGTATGACTACAAGACCATGACGG
FLAG-Mpl Rv	ATGCCCATATAAACAGCCAGCCACAAGGCTGGCTGACCGCATAGTCATCATATGAATATCCTCCTTAG

(*) En color se muestra la secuencia complementaria a la secuencia presente en el plásmido utilizado en el método de Uzzau y colaboradores (Uzzau *et al.*, 2001)

(&) Oligonucleótidos diseñados para etiquetar mediante el plásmido pKO3Blue, con el resto se empleó el plásmido pSUB11

Tabla A8. Oligonucleótidos empleados para el clonaje de genes cromosómicos de *S. Typhimurium* SV5015 (*)

Nombre	Secuencia 5'→3'	Gen	Plásmido
PBP 2 short Fw	CATGCCATGGATTACCAGACCCGCTCGAACGAAAACC	<i>mrdA</i>	pET24d(+)
PBP 2 short Rv	CCGCTCGAGTTGGTCTCCGCCGCTGCAACCACCGGG	<i>mrdA</i>	pET24d(+)
PBP 3 short Fw	CATGCCATGGATATGCTGGTGCCTCAGGGCGATATGC	<i>ftsI</i>	pET24d(+)
PBP 3 short Rv	CCGCTCGAGCGATCTGCCACCTGTTCCCTCGCCTTGA	<i>ftsI</i>	pET24d(+)
His STM1940 Fw	CCGCTCGAGTTCTATATAACCAAGCTTAAACAGAACC	<i>STM1940</i>	pET22b(+)
His STM1940 Rv(2)	GGAATTCATATGCACCAGACGACCTACCGATCAACA	<i>STM1940</i>	pET22b(+)

(*) En color se muestra la secuencia de los sitios de restricción

Tabla A9. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de DNA desde plásmido

Nombre	Secuencia 5'→3'	Plásmido
T7 promoter primer	TAATACGACTCACTATAGGG	pET22b(+)/pET24d(+)
T7 terminator primer	TATGCTAGTTATTGCTCAG	pET22b(+)/pET24d(+)
PKD13-1F	AGCACGAGGAAGCGGCTCAGCCC	pKD13/pSUB11
PKD13-2R	CGAGGCAGCGCGGCTATCGTGG	pKD13/pSUB11

Tabla A10. Estirpes de *S. enterica* serovar *Typhimurium* etiquetadas en este trabajo

Estirpe	Genotipo
1	
MD3206	<i>mrcA</i> ::3xFLAG- <i>kan</i>
MD3208	<i>dacB</i> ::3xFLAG- <i>kan</i>
MD3209	<i>dacA</i> ::3xFLAG- <i>kan</i>
MD2540	<i>STM1910</i> ::3xFLAG- <i>kan</i>
MD3241	<i>ampH</i> ::3xFLAG- <i>kan</i>
MD3245	<i>mrcA</i> ::3xFLAG
MD3248	<i>mrcA</i> ::3xFLAG <i>dacB</i> ::3xFLAG- <i>kan</i>
MD3252	<i>mrcA</i> ::3xFLAG <i>dacB</i> ::3xFLAG
MD3275	<i>mrcA</i> ::3xFLAG <i>dacB</i> ::3xFLAG <i>dacA</i> ::3xFLAG- <i>kan</i>
MD3286	<i>mrcA</i> ::3xFLAG <i>dacB</i> ::3xFLAG <i>dacA</i> ::3xFLAG
MD3289	<i>mrcA</i> ::3xFLAG <i>dacB</i> ::3xFLAG <i>dacA</i> ::3xFLAG <i>STM1910</i> ::3xFLAG- <i>kan</i>
MD3364	<i>mrcA</i> ::3xFLAG <i>dacB</i> ::3xFLAG <i>dacA</i> ::3xFLAG <i>STM1910</i> ::3xFLAG
MD3368	<i>mrcA</i> ::3xFLAG <i>dacB</i> ::3xFLAG <i>dacA</i> ::3xFLAG <i>STM1910</i> ::3xFLAG <i>ampH</i> ::3xFLAG- <i>kan</i>
2	
MD3207	<i>mrcB</i> ::3xFLAG- <i>kan</i>
MD3238	<i>dacC</i> ::3xFLAG- <i>kan</i>
MD2559	<i>STM1836</i> ::3xFLAG- <i>kan</i>
MD3240	<i>pbpG</i> ::3xFLAG- <i>kan</i>
MD3246	<i>mrcB</i> ::3xFLAG
MD3253	<i>mrcB</i> ::3xFLAG <i>dacC</i> ::3xFLAG- <i>kan</i>
MD3258	<i>mrcB</i> ::3xFLAG <i>dacC</i> ::3xFLAG
MD3270	<i>mrcB</i> ::3xFLAG <i>dacC</i> ::3xFLAG <i>STM1836</i> ::3xFLAG- <i>kan</i>

MD3287	<i>mrcB::3xFLAG dacC::3xFLAG STM1836::3xFLAG</i>
MD3290	<i>mrcB::3xFLAG dacC::3xFLAG STM1836::3xFLAG pbpG::3xFLAG-kan</i>
MD3707	<i>mrcB::3xFLAG dacC::3xFLAG STM1836::3xFLAG pbpG::3xFLAG</i>
3	
MD3298	<i>mepA::3xFLAG</i>
MD3239	<i>dacD::3xFLAG-kan</i>
MD3728	<i>mltF::3xFLAG-kan</i>
MD3283	<i>mltB::3xFLAG-kan</i>
MD3354	<i>mepA::3xFLAG dacD::3xFLAG-kan</i>
MD3709	<i>mepA::3xFLAG dacD::3xFLAG</i>
MD3801	<i>mepA::3xFLAG dacD::3xFLAG mltF::3xFLAG-kan</i>
MD3802	<i>mepA::3xFLAG dacD::3xFLAG mltF::3xFLAG</i>
MD3790	<i>mepA::3xFLAG dacD::3xFLAG mltF::3xFLAG mltB::3xFLAG-kan</i>
4	
MD3282	<i>slt::3xFLAG-kan</i>
MD3276	<i>ldcA::3xFLAG-kan</i>
MD3278	<i>amiC::3xFLAG-kan</i>
MD3281	<i>mltA::3xFLAG-kan</i>
MD3292	<i>slt::3xFLAG</i>
MD3294	<i>slt::3xFLAG ldcA::3xFLAG-kan</i>
MD3299	<i>slt::3xFLAG ldcA::3xFLAG</i>
MD3328	<i>slt::3xFLAG ldcA::3xFLAG amiC::3xFLAG-kan</i>
MD3342	<i>slt::3xFLAG ldcA::3xFLAG amiC::3xFLAG</i>
MD3378	<i>slt::3xFLAG ldcA::3xFLAG amiC::3xFLAG mltA::3xFLAG-kan</i>
5	
MD3279	<i>emtA::3xFLAG-kan</i>
MD3284	<i>mltD::3xFLAG-kan</i>
MD3302	<i>mltC::3xFLAG-kan</i>
MD3777	<i>ybiS::3xFLAG-kan</i>
MD3293	<i>emtA::3xFLAG</i>
MD3295	<i>emtA::3xFLAG mltD::3xFLAG-kan</i>
MD3300	<i>emtA::3xFLAG mltD::3xFLAG</i>
MD3329	<i>emtA::3xFLAG mltD::3xFLAG mltC::3xFLAG-kan</i>
MD3343	<i>emtA::3xFLAG mltD::3xFLAG mltC::3xFLAG-kan</i>
MD3708	<i>emtA::3xFLAG mltD::3xFLAG mltC::3xFLAG</i>
MD3797	<i>emtA::3xFLAG mltD::3xFLAG mltC::3xFLAG ybiS::3xFLAG-kan</i>
6	
MD3365	<i>nagZ::3xFLAG-kan</i>
MD3385	<i>mtgA::3xFLAG-kan</i>
MD3351	<i>STM1940::3xFLAG-kan</i>
MD3393	<i>nagZ::3xFLAG</i>
MD3396	<i>nagZ::3xFLAG mtgA::3xFLAG-kan</i>
MD3712	<i>nagZ::3xFLAG mtgA::3xFLAG</i>
MD3737	<i>nagZ::3xFLAG mtgA::3xFLAG STM1940::3xFLAG-kan</i>
7	
MD3776	<i>erfK::3xFLAG-kan</i>
MD3782	<i>ycfS::3xFLAG-kan</i>

MD3778	<i>ycbB::3xFLAG-kan</i>
MD3783	<i>ynhG::3xFLAG-kan</i>
MD3821	<i>erfK::3xFLAG</i>
MD3823	<i>erfK::3xFLAG ycfS::3xFLAG-kan</i>
MD3824	<i>erfK::3xFLAG ycfS::3xFLAG</i>
MD3807	<i>erfK::3xFLAG ycfS::3xFLAG ycbB::3xFLAG-kan</i>
MD3808	<i>erfK::3xFLAG ycfS::3xFLAG ycbB::3xFLAG</i>
MD3799	<i>erfK::3xFLAG ycfS::3xFLAG ycbB::3xFLAG ynhG::3xFLAG-kan</i>
8	
MD3752	<i>mpl::3xFLAG-kan</i>
MD3366	<i>nlpC::3xFLAG-kan</i>
MD3839	<i>spr::3xFLAG-kan</i>
MD3789	<i>mpl::3xFLAG</i>
MD3886	<i>mpl::3xFLAG nlpC::3xFLAG-kan</i>
MD3838	<i>mpl::3xFLAG nlpC::3xFLAG</i>
MD3901	<i>mpl::3xFLAG nlpC::3xFLAG spr::3xFLAG-kan</i>
OTRAS	
MD3237	<i>pbpC::3xFLAG-kan</i>
MD3288	<i>STM4217::3xFLAG</i>
MD3943	<i>ydhO::3xFLAG-kan</i>

Tabla A11. Estirpes de *S. enterica* serovar Typhimurium portando mutaciones en genes relacionados con el metabolismo del peptidoglicano (*)

Estirpe	Genotipo
MD2591	$\Delta mrcA$
MD2569	$\Delta mrcB$
MD2535	$\Delta pbpC$
MD2517	$\Delta STM1910::kan$
MD2502	$\Delta STM1836::kan$
MD2538	$\Delta mtgA::kan$
MD3770	$\Delta erfK::kan$
MD3771	$\Delta ybiS::kan$
MD3784	$\Delta ycfS::kan$
MD3772	$\Delta ycbB::kan$
MD3779	$\Delta ynhG::kan$
MD3780	$\Delta yafK::kan$
MD3781	$\Delta STM3277::kan$
MD3352	$\Delta ydhO::kan$
MD3711	$\Delta spr::kan$
MD3367	$\Delta nlpC::kan$
MD3350	$\Delta STM1940::kan$
MD3250	$\Delta yibP-yigQ::kan$
MD2551	$\Delta mltA::kan$
MD2529	$\Delta mltB::kan$
MD3932	$\Delta mltC-nupG::kan$
MD2553	$\Delta mltD::kan$

MD2531	<i>ΔemtA::kan</i>
MD3715	<i>ΔmltF::kan</i>
MD2556	<i>Δslt::kan</i>
MD2575	<i>ΔSTM4216-4218</i>
MD2541	<i>ΔamiA::kan</i>
MD2542	<i>ΔamiB::kan</i>
MD2530	<i>ΔamiC::kan</i>
MD2550	<i>ΔampD::kan</i>
MD2552	<i>ΔnagZ::kan</i>
MD2557	<i>ΔldcA::kan</i>
MD3753	<i>Δmpl::kan</i>
MD3353	<i>ΔycjI::kan</i>
MD2555	<i>ΔdacC</i>
MD2558	<i>ΔdacC ΔdacD::kan</i>
MD2562	<i>ΔdacC ΔdacD</i>
MD2568	<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG::kan</i>
MD2570	<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG</i>
MD2571	<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG ΔSTM1910::kan</i>
MD2572	<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG ΔSTM1836::kan</i>
MD3835	<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG ΔSTM1940::kan</i>
MD2573	<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG ΔdacB::kan</i>
MD2574	<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG ΔdacA::kan</i>
MD2581	<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG ΔdacA</i>
MD2587	<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG ΔdacA ΔdacB::kan</i>
MD2600	<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG ΔdacA ΔdacB</i>
MD3271	<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG ΔdacA ΔdacB ΔmrcA::kan</i>
MD3272	<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG ΔdacA ΔdacB ΔmrcB::kan</i>
MD3273	<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG ΔdacA ΔdacB ΔSTM1910::kan</i>
MD3347	<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG ΔdacA ΔdacB ΔSTM1910</i>
MD3274	<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG ΔdacA ΔdacB ΔSTM1836::kan</i>
MD3356	<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG ΔdacA ΔdacB ΔSTM1910 ΔSTM1836::kan</i>
MD3880	<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG ΔdacA ΔdacB ΔampH::kan</i>
MD3381	<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG ΔmltD::kan</i>
MD3387	<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG ΔmltD</i>
MD3362	<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG ΔmltD ΔmtgA::kan</i>
MD3827	<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG ΔmltD ΔmtgA</i>
MD3828	<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG ΔmltD ΔmtgA ΔmltA::kan</i>
MD3829	<i>ΔdacC ΔdacD ΔpbpG ΔmltD ΔmtgA ΔybiS::kan</i>
MD2576	<i>ΔSTM1910</i>
MD2580	<i>ΔSTM1910 ΔSTM1836::kan</i>
MD2588	<i>ΔSTM1910 ΔSTM1836</i>
MD2590	<i>ΔSTM1910 ΔSTM1836 ΔmrcA::kan</i>
MD3254	<i>ΔSTM1910 ΔSTM1836 ΔmrcA</i>
MD2589	<i>ΔSTM1910 ΔSTM1836 ΔmrcB::kan</i>
MD3255	<i>ΔSTM1910 ΔSTM1836 ΔmrcB</i>
MD3837	<i>ΔSTM1910 ΔSTM1836 ΔmtgA::kan</i>
MD3201	<i>ΔSTM1910 ΔmrcA::kan</i>

MD3202	Δ STM1910 Δ mrcB::kan
MD2577	Δ STM1836
MD3203	Δ STM1836 Δ mrcA::kan
MD3204	Δ STM1836 Δ mrcB::kan
MD3243	Δ dacB
MD3247	Δ dacB Δ dacA::kan
MD3251	Δ dacB Δ dacA
MD3257	Δ dacB Δ dacA Δ dacC::kan
MD3267	Δ dacB Δ dacA Δ dacC
MD3376	Δ pbpG Δ mrcA::kan
MD3377	Δ pbpG Δ mrcB::kan
MD3826	Δ ampD Δ ldcA::kan
MD3833	Δ ampD Δ ldcA
MD3836	Δ ampD Δ ldcA Δ nagZ::kan
MD3840	Δ slt
MD3857	Δ slt Δ mltD::kan
MD3858	Δ slt Δ mltD
MD3919	Δ slt Δ mltD Δ emtA::kan
MD3924	Δ slt Δ mltD Δ emtA
MD3925	Δ slt Δ mltD Δ emtA Δ mltF::kan
MD3932	Δ slt Δ mltD Δ emtA Δ mltC-nupG::kan
MD3934	Δ slt Δ mltD Δ emtA Δ STM4216-4218::kan
MD3946	Δ slt Δ mltD Δ mltC-nupG::kan
MD3941	Δ slt Δ mltD Δ emtA Δ mltA::kan
MD3942	Δ slt Δ mltD Δ emtA Δ mltB::kan
MD3873	Δ slt Δ mltD Δ nupG::kan
MD3878	Δ slt Δ mltD Δ nupG
MD3879	Δ slt Δ mltD Δ nupG Δ mltF::kan
MD3888	Δ erfK
MD3889	Δ erfK Δ ybiS
MD3890	Δ erfK Δ ybiS Δ ycfS::kan
MD3891	Δ erfK Δ ybiS Δ ycfS
MD3892	Δ erfK Δ ybiS Δ ycfS Δ ynhG
MD3893	Δ erfK Δ ybiS Δ ycfS Δ ynhG Δ ycbB::kan
MD3881	Δ erfK Δ ybiS Δ ycfS Δ ynhG Δ ycbB
MD3874	Δ erfK Δ ybiS Δ ycfS Δ ynhG Δ ycbB Δ yafK::kan
MD3916	Δ erfK Δ ybiS Δ ycfS Δ ynhG Δ ycbB Δ yafK
MD3917	Δ erfK Δ ybiS Δ ycfS Δ ynhG Δ ycbB Δ yafK Δ STM3277::kan
MD3876	Δ amiA
MD3959	Δ amiB
MD3958	Δ amiC
MD3830	Δ amiA Δ amiB::kan
MD3900	Δ amiA Δ amiB
MD3952	Δ amiA Δ amiC::kan
MD3953	Δ amiA Δ ampD::kan
MD3954	Δ amiA Δ ycjI::kan
MD3964	Δ amiB Δ amiC::kan

MD3965	<i>ΔamiB ΔycjI::kan</i>
MD3966	<i>ΔamiC ΔycjI::kan</i>
MD3955	<i>ΔampD ΔamiC::kan</i>
MD3956	<i>ΔampD ΔamiB::kan</i>
MD3957	<i>ΔampD ΔycjI::kan</i>
MD3902	<i>ΔamiA ΔamiB ΔamiC::kan</i>
MD3903	<i>ΔamiA ΔamiB ΔamiC</i>
MD3906	<i>ΔamiA ΔamiB ΔamiC ΔampD::kan</i>
MD3920	<i>ΔamiA ΔamiB ΔamiC ΔampD</i>
MD3921	<i>ΔamiA ΔamiB ΔamiC ΔampD ΔycjI::kan</i>
MD3877	<i>ΔSTM1940</i>
MD3831	<i>ΔSTM1940 ΔydhO::kan</i>
MD3899	<i>ΔSTM1940 ΔydhO</i>
MD3898	<i>ΔSTM1940 ΔydhO Δspr::kan</i>
MD3904	<i>ΔSTM1940 ΔydhO Δspr</i>
MD3907	<i>ΔSTM1940 ΔydhO Δspr ΔnlpC::kan</i>
MD3915	<i>ΔSTM1940 ΔydhO Δspr ΔnlpC</i>
MD3918	<i>ΔSTM1940 ΔydhO Δspr ΔnlpC ΔmepA::kan</i>
MD3931	<i>ΔSTM1940 ΔydhO Δspr ΔnlpC ΔmepA</i>
MD3935	<i>ΔSTM1940 ΔydhO Δspr ΔnlpC ΔmepA ΔyibP-yigQ::kan</i>
MD3937	<i>ΔSTM1940 ΔydhO Δspr ΔnlpC ΔmepA ΔyibP-yigQ</i>
MD3938	<i>ΔSTM1940 ΔydhO Δspr ΔnlpC ΔmepA ΔyibP-yigQ ΔampH::kan</i>
MD3939	<i>ΔSTM1940 ΔydhO Δspr ΔnlpC ΔmepA ΔyibP-yigQ ΔdacB::kan</i>
MD3940	<i>ΔSTM1940 ΔydhO Δspr ΔnlpC ΔmepA ΔyibP-yigQ ΔpbpG::kan</i>

(*) Todas las estirpes son isogénicas a la estirpe silvestre SV5015 (SL1344 His+)

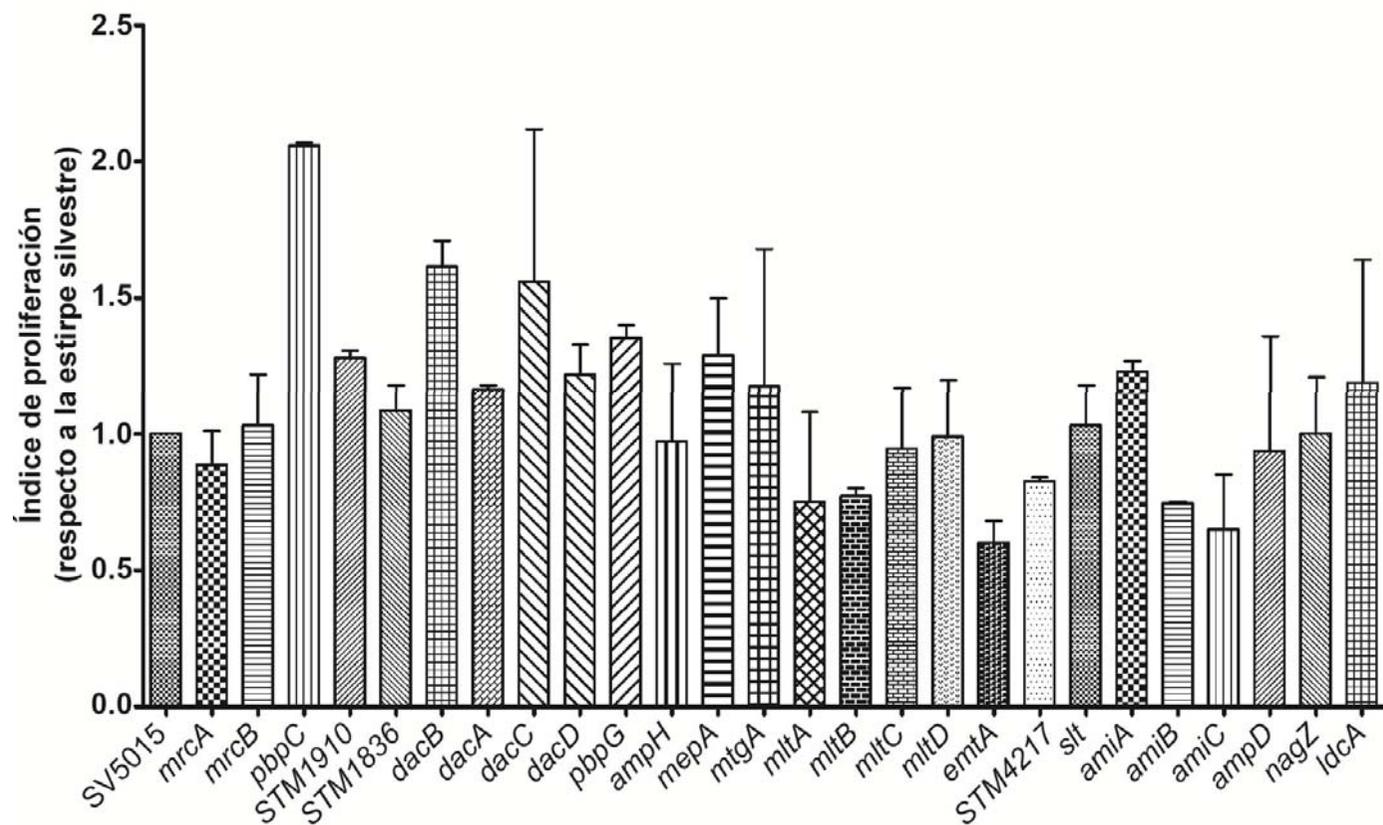


Figura A2. Tasas de proliferación intracelular en fibroblastos BJ-5ta de mutantes sencillos de *S. enterica* serovar Typhimurium en genes con actividad sobre el metabolismo del peptidoglicano. Se muestran las tasas de proliferación intracelular (Ipro) de los mutantes, resultantes de calcular el cociente entre el número de bacterias intracelulares viables a las 24 hpi frente a las 2 hpi. Análisis estadístico de los datos mediante ANOVA de una vía y post-test de Dunnett, comparando las medias de los mutantes con la de la estirpe silvestre. Los valores mostrados corresponden a la media y la desviación estándar relativos a la estirpe silvestre de un mínimo de tres experimentos independientes.

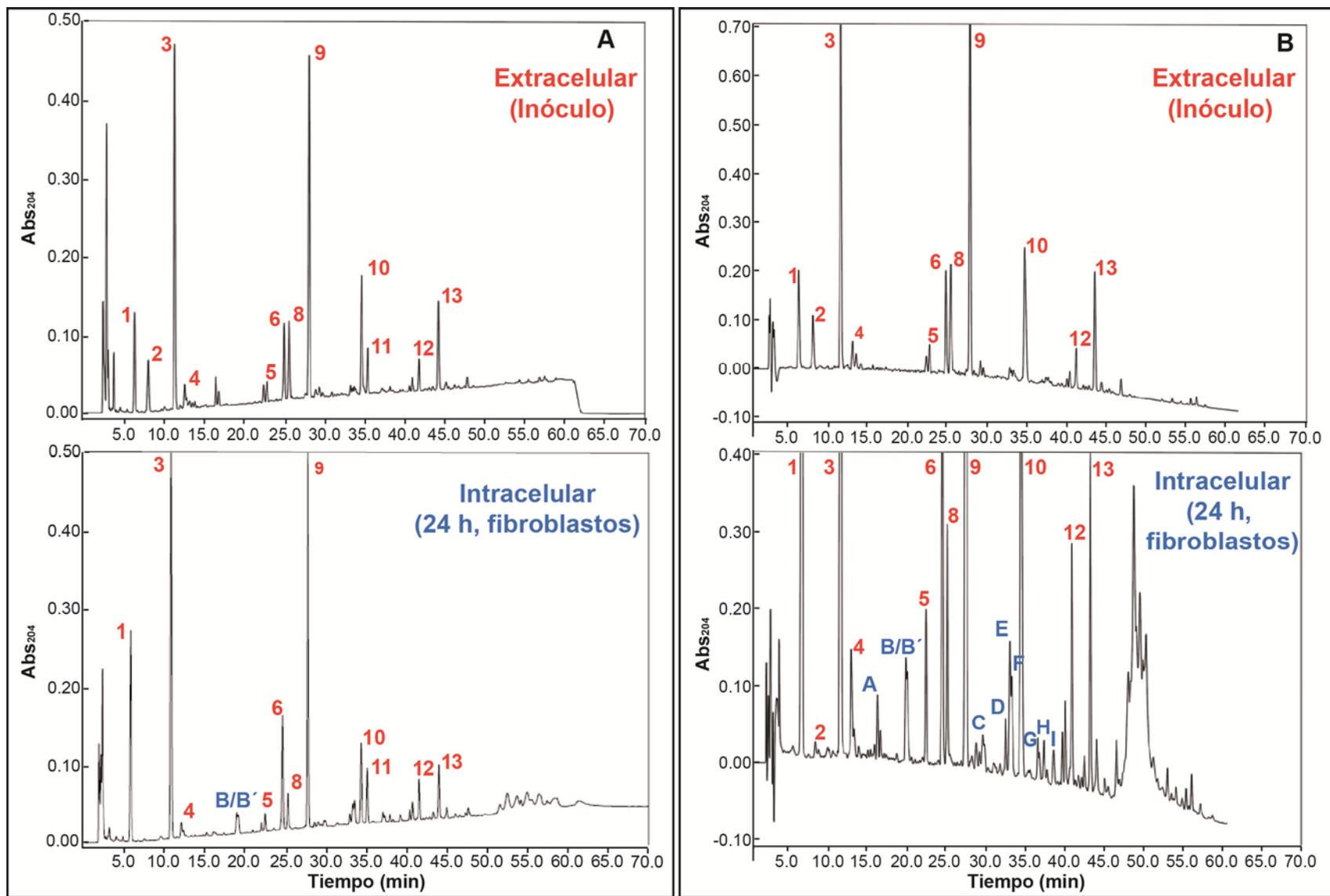


Figura A3. Comparativa del perfil de muropéptidos en el peptidoglicano de las estirpes SV5015 y *phoP7953::Tn10* correspondientes a bacteria intracelular aislada de fibroblastos BJ-5ta. **A:** cromatograma de HPLC de la estirpe silvestre SV5015. **B:** cromatograma de HPLC de la estirpe *phoP7953::Tn10*. En los cromatogramas superiores se muestran los perfiles obtenidos de la bacteria empleada para infectar los fibroblastos. En la parte inferior se muestran los cromatogramas de bacteria intracelular obtenida de los fibroblastos BJ-5ta tras 24 h de infección. Los números en rojo corresponden a muropéptidos ya presentes en la bacteria del inóculo y representados en la **figura 37**. Las letras en azul señalan los muropéptidos de nueva aparición en bacteria intracelular, representados en la **figura 40**.

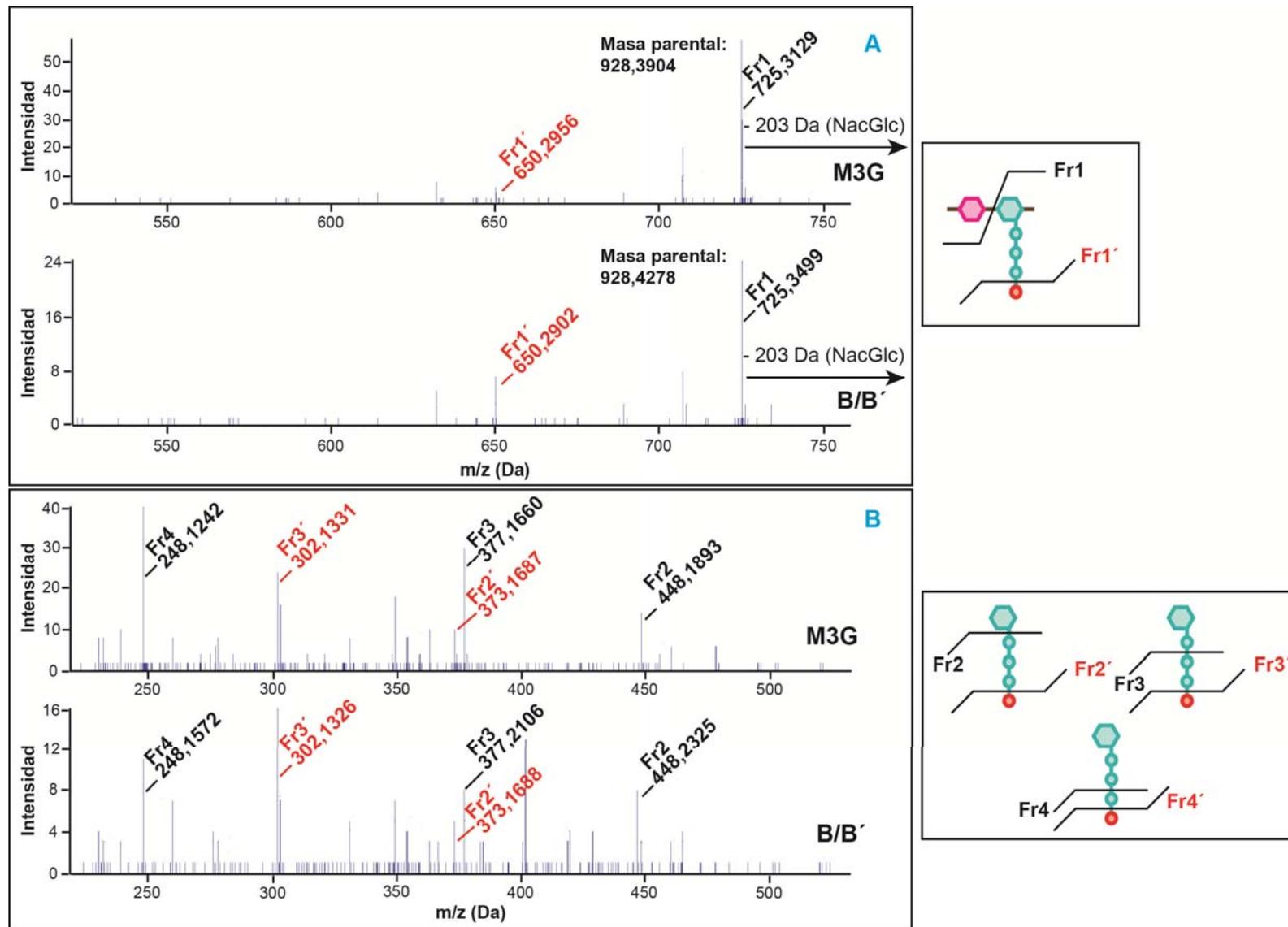


Figura A4a. Espectros completos de fragmentación MSMS obtenidos por ESI-QTOF y correspondientes a los muropéptidos M3G y B/B'. Se indican las relaciones masa/carga (m/z) de cada uno de los productos de la fragmentación de los compuestos parentales M3G y B/B'. **A:** detalle de la fragmentación de Fr1 a Fr1'. **B:** detalle de la fragmentación de Fr2 a Fr2', de Fr3 a Fr3' y Fr4 (véase **figura 43**). A la derecha de cada espectro se representan los enlaces por los que se cortan los productos de la fragmentación de los muropéptidos M3G y B/B'. Fr1: NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-Gly/X; Fr1': NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap; Fr2: L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-Gly/X; Fr2': L-Ala-D-Glu-*m*-Dap; Fr3: D-Glu-*m*-Dap-Gly/X; Fr3': D-Glu-*m*-Dap; Fr4: *m*-Dap-Gly/X.

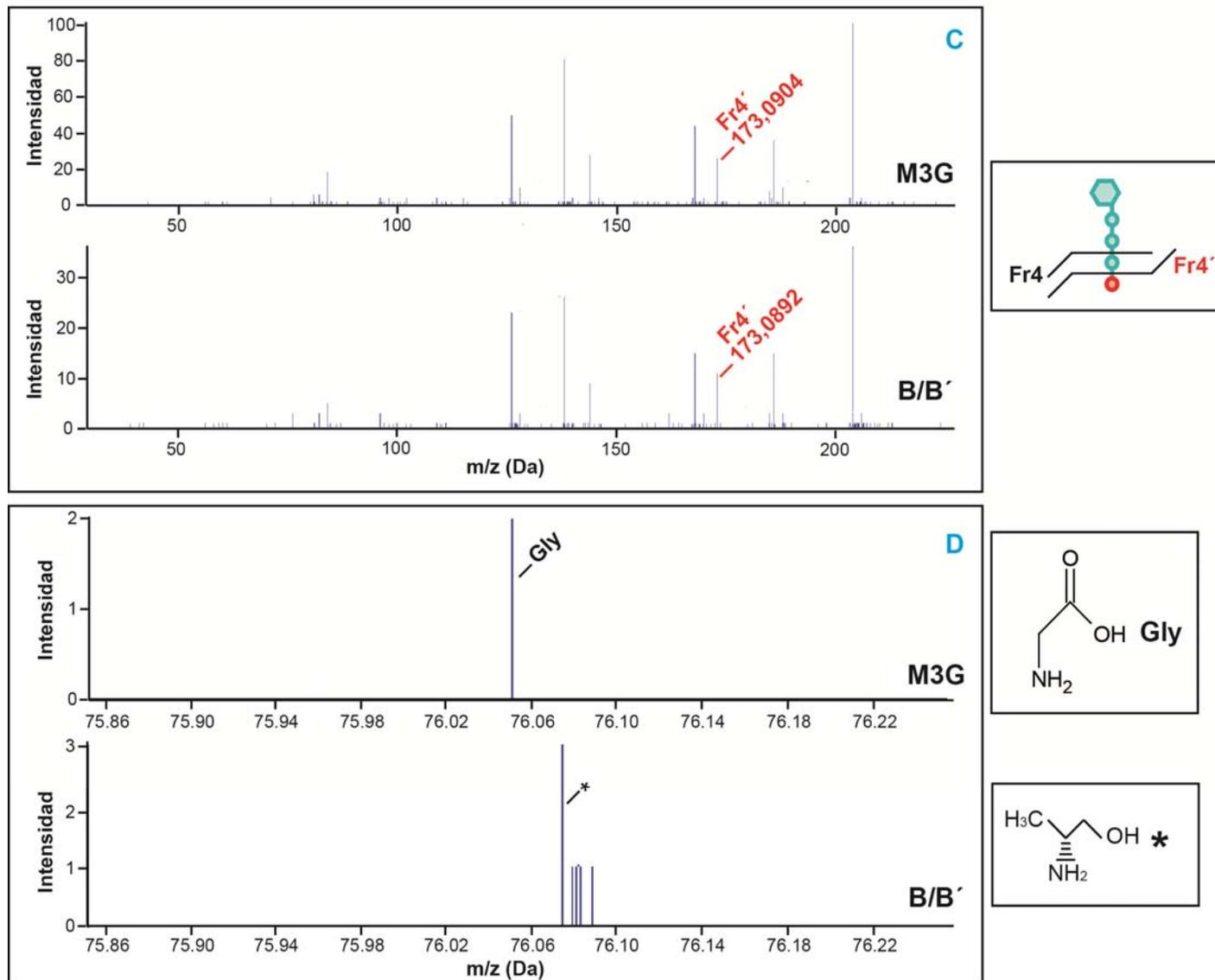


Figura A4b. Espectros completos de la fragmentación MSMS obtenidos por ESI-QTOF y correspondiente a los muropéptidos M3G y B/B'. C: se observa la relación masa/carga (m/z) del producto de fragmentación de Fr4 a Fr4', tanto de M3G como de B/B'. A la derecha se representa el enlace por el que se fragmenta Fr4. D: detalle de la relación masa/carga (m/z) de la glicina (Gly) del muropéptido M3G respecto al aminoalcohol problema (*) del muropéptido B/B'. A la derecha se representan tanto la glicina (Gly) como una de las posibles estructuras del aminoalcohol problema. Fr4': Gly/X.

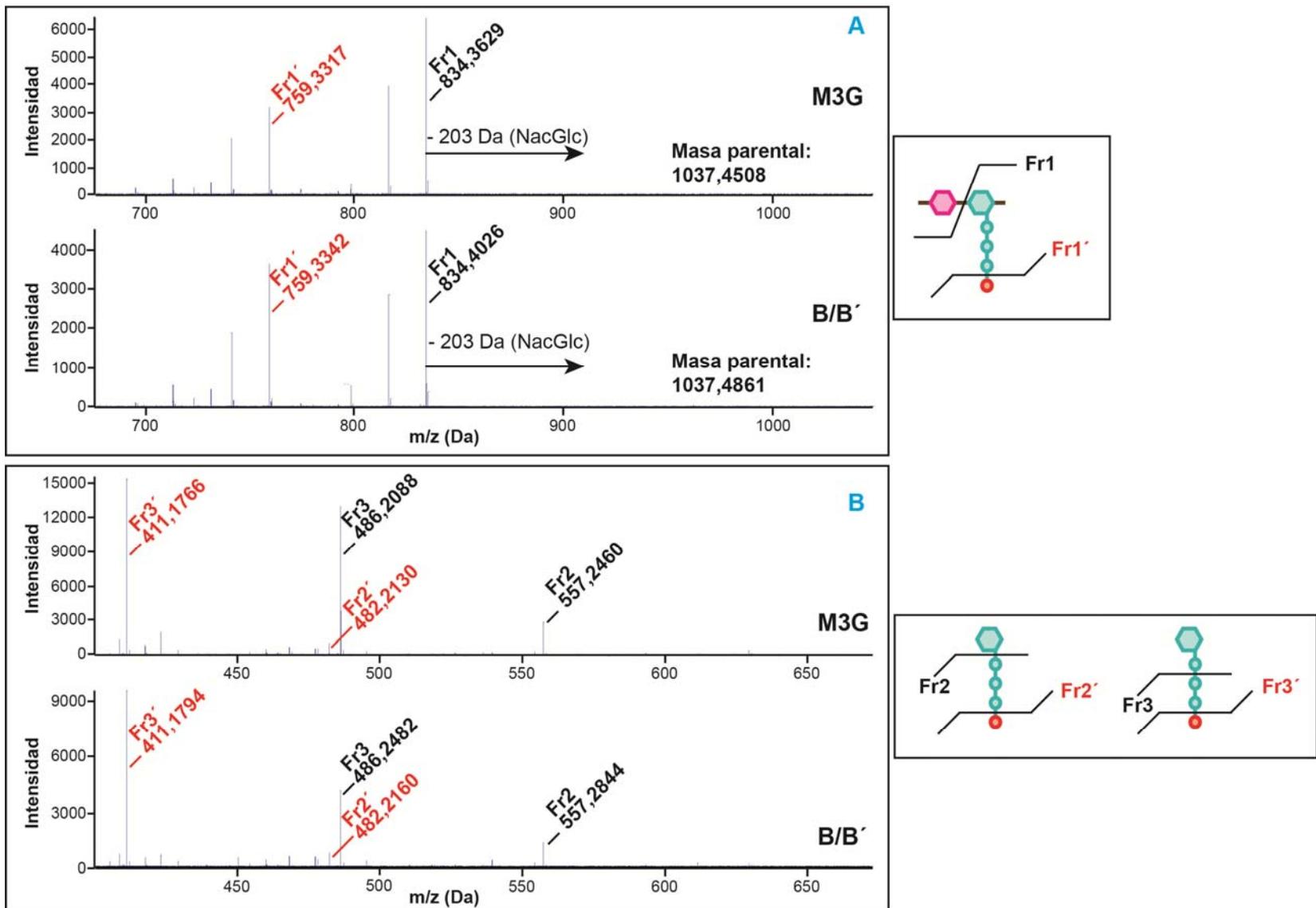


Figura A5. Epectros completos de fragmentación de los muropéptidos M3G y B/B' incubados con ICPL. Se muestran los valores de masa/carga (m/z) de cada uno de los productos de fragmentación de los muropéptidos parentales M3G y B/B' previamente incubados con ICPL. **A:** detalle de la fragmentación de Fr1 a Fr1'. **B:** detalle de la fragmentación de Fr2 a Fr2' y de Fr3 a Fr3'. A la derecha de cada espectro se muestran los enlaces por los que se rompen los productos de la fragmentación de los muropéptidos M3G y B/B'. Fr1: NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-(ICPL)-Gly/X; Fr1': NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-(ICPL); Fr2: L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-(ICPL)-Gly/X; Fr2': L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-(ICPL); Fr3: D-Glu-*m*-Dap-(ICPL)-Gly/X; Fr3': D-Glu-*m*-Dap-(ICPL).

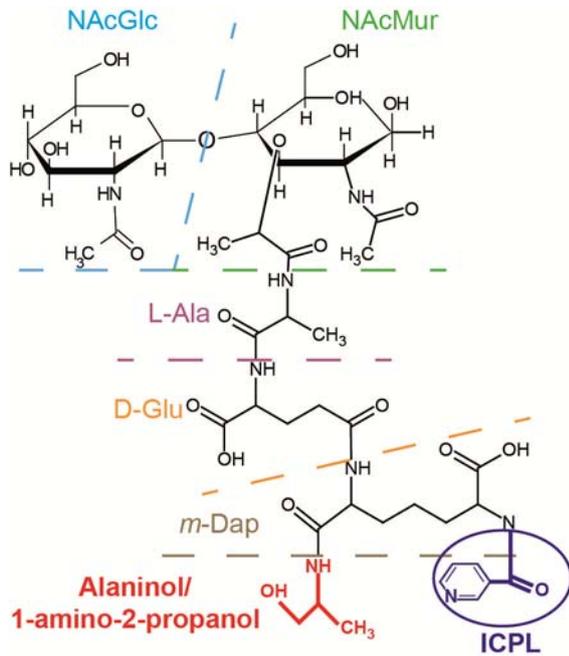


Figura A6. Posible estructura del muropéptido B/B' marcado con ICPL. Se indican los enlaces cuya rotura da lugar a productos de fragmentación identificados en el análisis de masas. Azul: NAcGlc; verde: NAcMur; morado: L-Ala; amarillo: D-Glu; gris: *m*-Dap; rojo: aminoalcohol (alaninol/1-amino-2-propanol). Se señala con un círculo añil el reactivo ICPL unido al que era el grupo amino libre del *m*-Dap.

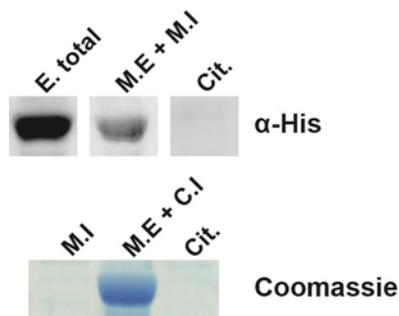


Figura A7. Localización subcelular de STM1940 en *S. enterica* serovar Typhimurium. Se muestra un Western realizado con el anticuerpo anti-6xHis (α-His) sobre las fracciones subcelulares de la estirpe *STM1940::6xHis* que incluyen: E. total, extracto total; M.E, membrana externa; M.I, membrana interna; y, Cit, citoplasma. También se muestra una tinción de Coomassie en la que se observa que la proteína se localiza en la fracción de membrana externa junto con cuerpos de inclusión (C.I).

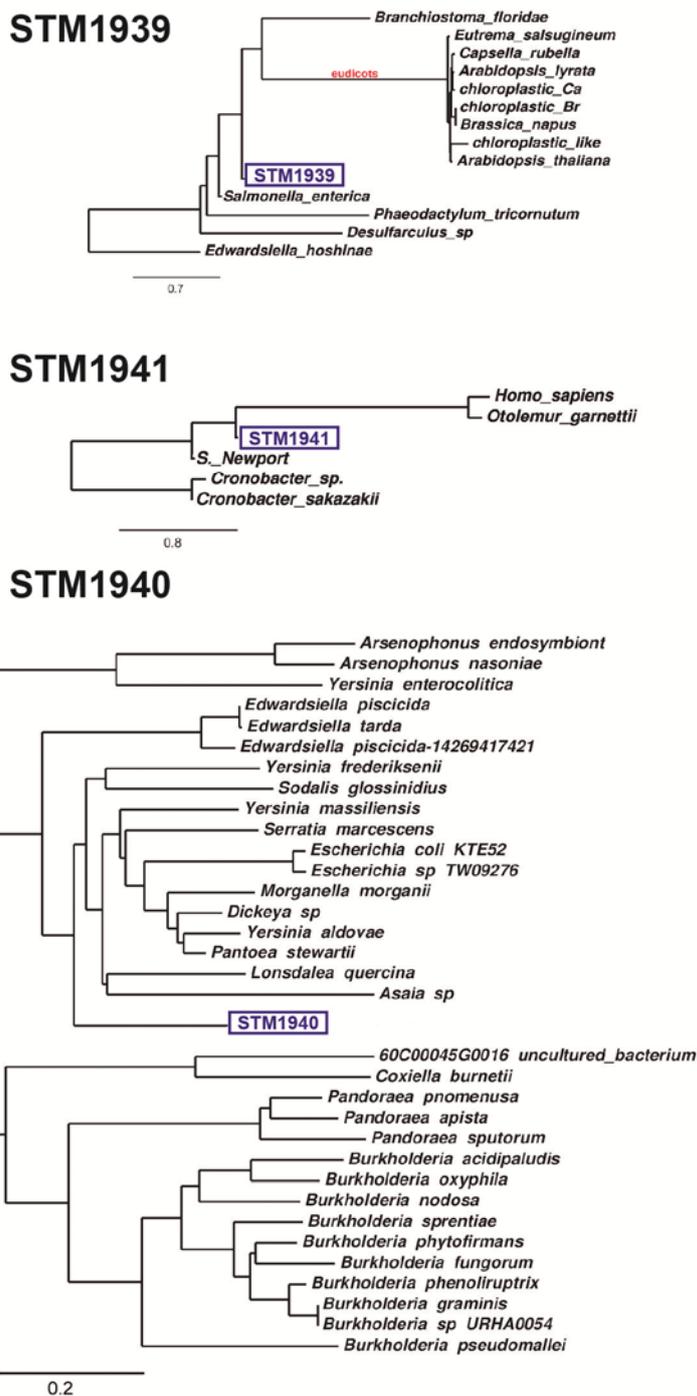


Figura A8. Distribución filogenética “fuera” del género *Salmonella* de ortólogos de STM1939, STM1940 y STM1941 de *S. enterica* serovar Typhimurium. Los alineamientos obtenidos tras realizar una búsqueda BLASTp frente a toda la base de datos de NCBI excluyendo al género *Salmonella* se cargaron como archivos Newick en el servidor Phylogeny.fr (<http://phylogeny.lirmm.fr/phylo-cgi/index.cgi>) utilizando el visor de árboles TreeDyn. Estas herramientas bioinformáticas se describen en (Dereeper *et al.*, 2008).

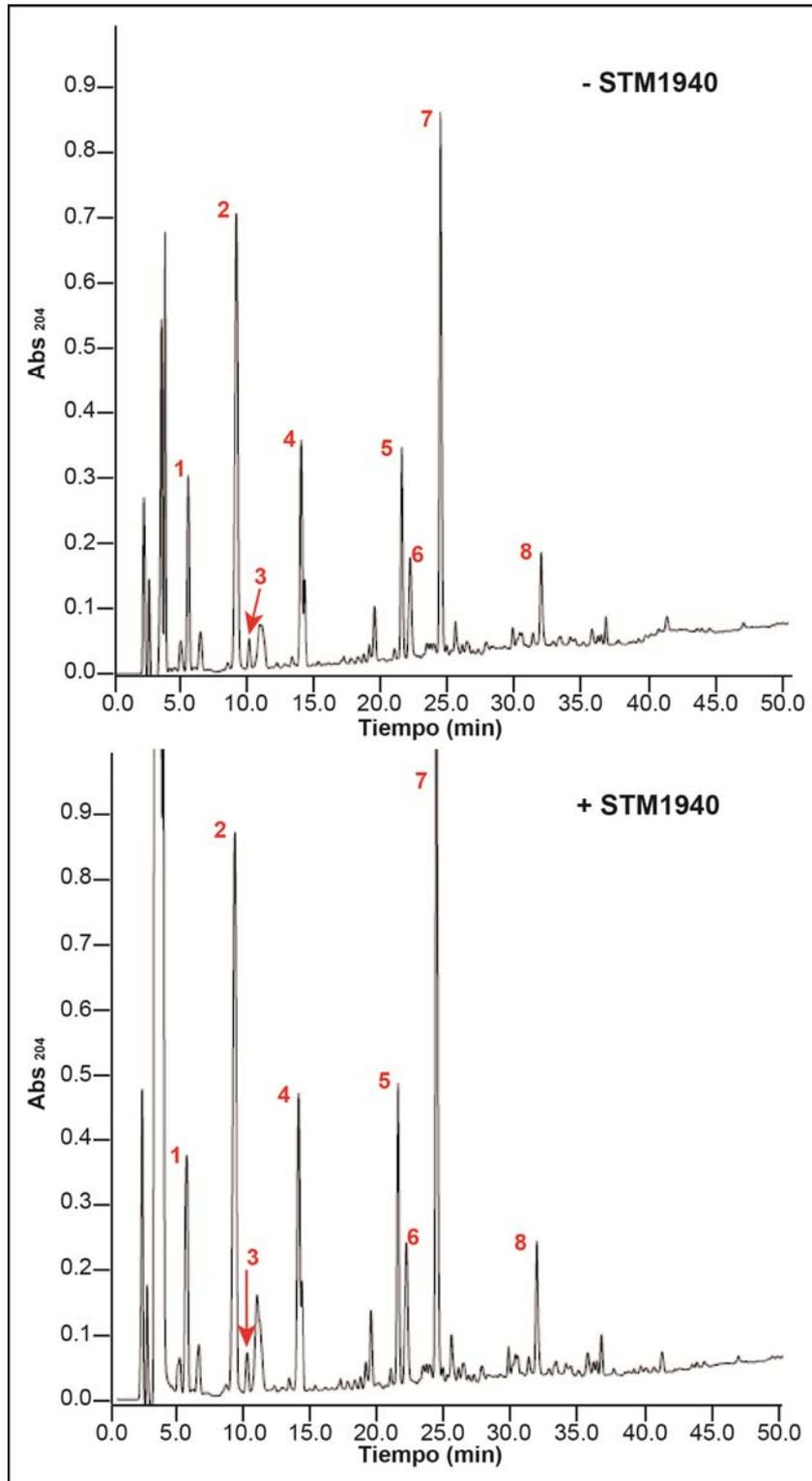


Figura A9. Ausencia de actividad DL-endopeptidasa/DL-carboxipeptidasa de la proteína purificada STM1940 sobre peptidoglicano macromolecular. Se muestran los perfiles de HPLC obtenidos tras la incubación de sáculo purificado de *S. Typhimurium* en ausencia/presencia de STM1940. Con números se indican los muropéptidos más abundantes de estructura química conocida. 1=M3: NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap; 2=M4: NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-D-Ala; 3=M2: NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu; 4=M3L: NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-Lys-Arg; 5=D43D: NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-*m*-Dap-(D-Ala)-D-Glu-L-Ala-NAcMur-NAcGlc; 6=D43: NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-D-Ala-*m*-Dap-D-Glu-L-Ala-NAcMur-NAcGlc; 7=D44: NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-D-Ala-*m*-Dap-(D-Ala)-D-Glu-L-Ala-NAcMur-NAcGlc; 8=T444: NAcGlc-NAcMur-L-Ala-D-Glu-*m*-Dap-D-Ala-*m*-Dap-(D-Ala)[D-Ala-*m*-Dap-D-Glu-L-Ala-NAcMur-NAcGlc]-D-Glu-L-Ala-NAcMur-NAcGlc.

BIBLIOGRAFÍA

- Cherepanov PP & Wackernagel W (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**: 9-14.
- Datsenko KA & Wanner BL (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 6640-5.
- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM & Gascuel O (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* **36**: 465-469.
- Fields PI, Swanson R V., Haidaris CG & Heffron F (1986). Mutants of *Salmonella* Typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 5189-5193.
- Hanahan D (1983). Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Mariscotti JF & García-del Portillo F (2009). Genome Expression Analyses Revealing the Modulation of the *Salmonella* Rcs Regulon by the Attenuator IgaA. *J. Bacteriol.* **191**: 1855-1867.
- Solano C, García B, Latasa C, Toledo-Arana A, Zorraquino V, Valle J, Casals J, Pedrosa E & Lasa I (2009). Genetic reductionist approach for dissecting individual roles of GGDEF proteins within the c-di-GMP signaling network in *Salmonella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 7997-8002.
- Studier FW, Daegelen P, Lenski RE, Maslov S & Kim JF (2009). Understanding the Differences between Genome Sequences of *Escherichia coli* B Strains REL606 and BL21(DE3) and Comparison of the *E. coli* B and K-12 Genomes. *J. Mol. Biol.* **394**: 653-680.
- Uzzau S, Figueroa-Bossi N, Rubino S & Bossi L (2001). Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 15264-9.

ANEXO II

Artículos publicados

