

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



CONTRIBUCIÓN DE LOS
SISTEMAS TOXINA-ANTITOXINA DE
Salmonella enterica serovar Typhimurium
EN LA ADAPTACIÓN A LA VIDA INTRACELULAR

TESIS DOCTORAL
DAMIÁN LOBATO MÁRQUEZ
Madrid 2015

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid



CONTRIBUCIÓN DE LOS
SISTEMAS TOXINA-ANTITOXINA DE
Salmonella enterica serovar Typhimurium
EN LA ADAPTACIÓN A LA VIDA INTRACELULAR

Damián Lobato Márquez

Licenciado en Biología

Directores:

Ramón Díaz Orejas y Francisco García del Portillo

Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC)

Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC)



El trabajo recogido en la presente memoria ha sido realizado por Damián Lobato Márquez bajo la dirección del Dr. Ramón Díaz Orejas y el Dr. Francisco García del Portillo en los Departamentos de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones del Centro de Investigaciones Biológicas y Biotecnología Microbiana del Centro Nacional de Biotecnología, ambos pertenecientes al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Este trabajo ha sido posible gracias a la ayuda de Formación de Profesorado Universitario (FPU) concedida por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (AP2009-0967) y la beca concedida por la “*European Molecular Biology Organization*” –EMBO- (ASTF 107-2014).

Opta al grado de Doctor

VºBº Directores de Tesis

Damián Lobato Márquez

Ramón Díaz Orejas

Francisco García del Portillo

A mi familia y amigos

“En la ciencia como en la vida,
debes ser como una esponja. De
todo el mundo podrás absorber
algún conocimiento nuevo”

Elena Pérez-Urria Carril

Resulta complicado resumir en una página toda la ayuda y apoyo que a lo largo de este trabajo he recibido de tantísima gente. En primer lugar me gustaría destacar a las tres personas sin las cuales ahora mismo no estaría escribiendo estas líneas: Elena, Ramón y Laura. A Elena, tutora y amiga, le agradezco la increíble confianza que siempre ha depositado en mí, y su apoyo incondicional, al que siempre ha considerado como “su chico”. Fue ella quien me guió durante la primera etapa de mi formación universitaria, y la que me ha dado muy sabios e importantes consejos.

Aun sabiendo que la fecha de su jubilación corría en nuestra contra, Ramón creyó en mí desde el principio. Persona inteligente, atenta y amable, cuya puerta siempre ha estado abierta a mis dudas e inquietudes, me ha guiado durante el trabajo de estos cinco intensos años.

Si Ramón y Elena han sido dos pilares importantes a lo largo de esta Tesis, Laura ha sido el cimiento sin el cual esta construcción se habría venido abajo en más de una ocasión. Las discusiones críticas sobre “amiloides funcionales” y “sistemas toxina-antitoxina” en la hora de la cena no tienen parangón con ningún seminario científico al que haya asistido. Gracias por estar siempre a mi lado.

Gracias a Paco y a Rafa. A Paco le agradezco que junto a Ramón me haya permitido combinar dos temáticas tan apasionantes como la infección y los sistemas toxina-antitoxina. Además, como co-director de esta Tesis, siempre me ha aconsejado y guiado. A Rafa le agradezco el haberme tratado siempre como uno más de su grupo y haberme prestado su ayuda y conocimientos siempre que los he necesitado.

Gracias a Miguel, Ana M^a, Eli y María Moreno, de los que he aprendido y disfrutado de muy buenos momentos. Sin todos ellos mi paso por el CIB no habría sido igual.

Gracias a Graciela, Gadea, Diana, Juanjo, Noelia, Alberto, Virginia, Estel, Pablo y Álvaro. Todos ellos me han ayudado muchísimo y desde un principio me integraron como un “*dos-ochentero*” más en el CNB.

Gracias a Virtu, Jose, Gloria, Srdja, Inma, Sofi, Cris, María Degayón y Juan Francisco por haber estado siempre dispuestos a echarme una mano y haberme aportado buenas y útiles ideas.

Para terminar, no podía olvidarme de la familia, la cual vive nuestras penas y alegrías casi a diario. Gracias a mi hermano Samuel y mi hermana adoptiva Joana por aguantar nuestros “tostones frikis” y estar siempre pendientes. A mi madre Manoli y a mi padre José Luis por haberme animado a seguir siempre hacia adelante. Aunque finalmente no he podido “*matar a la bacteria*” como siempre ha preguntado mi padre, creo que por lo menos he llegado al final de esta etapa.

Gracias a todos.

Los sistemas toxina-antitoxina (TA) están compuestos por dos genes de pequeño tamaño que codifican una antitoxina inestable y una toxina químicamente más estable. Los sistemas TA son muy abundantes en el dominio Bacteria, y aparecen en el genoma de bacterias de vida libre, simbióticas y patógenas. Las toxinas tienen actividades comprendiendo desde ARNasas a inhibidores de ADN girasa, siendo su efecto en la célula principalmente bacteriostático. Los sistemas TA están implicados en distintos procesos como la supervivencia durante la escasez de nutrientes, la respuesta a estrés oxidativo, la formación de biopelículas o la tolerancia a antibióticos. Los sistemas TA se han relacionado también con el proceso de infección de diversas bacterias patógenas. Así, *Escherichia coli* uropatógena, *Haemophilus influenzae* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) emplean sistemas TA para colonizar y sobrevivir en órganos infectados.

S. enterica es un patógeno intracelular que causa infecciones persistentes tanto en humanos como en ganado. En distintos modelos de ratón se ha comprobado que el serovar Typhimurium puede provocar tanto infección aguda como crónica. *S. Typhimurium* infecta preferencialmente macrófagos, aunque también puede infectar otros tipos celulares como fibroblastos, donde este patógeno atenúa su crecimiento. El objetivo de esta Tesis Doctoral fue determinar la posible implicación de los sistemas TA de *S. Typhimurium* durante la infección y supervivencia intracelular en células eucariotas. Empleando métodos informáticos, se detectaron 27 posibles sistemas TA en el genoma de la estirpe SL1344 de *S. Typhimurium*. Ensayos funcionales, basados en la inhibición de crecimiento por las toxinas y neutralización de esta inhibición por las antitoxinas, determinaron que únicamente 18 módulos TA son completamente funcionales. Se observó que la bacteria intracelular induce algunos sistemas preferentemente en fibroblastos pero no en células epiteliales. Además, se probaron en modelos de infección un total de 10 mutantes de delección en sistemas TA, de los que cinco mostraron un descenso en la supervivencia intracelular en fibroblastos y uno en células epiteliales. Estos resultados indican una posible especialización de determinados sistemas TA involucrados en la supervivencia intracelular del patógeno en distintos tipos celulares.

SUMMARY

SUMMARY

Toxin-antitoxin modules (hereafter TA) are operons composed of two small genes encoding an unstable antitoxin and a stable toxin. TA loci abound in microbial genomes and are found in free-living, symbiotic and obligate intracellular bacteria. Toxins exhibit activities ranging from RNAses to DNA gyrase inhibitors, and mainly trigger bacteriostatic effects. TA modules are implicated in processes such as survival in response to nutrient starvation, response to oxidative damage, biofilm formation or tolerance to antibiotics. In addition, recent studies have focused in understanding whether TA modules contribute to pathogen survival during infection. Thus, uropathogenic *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) use TA modules to colonize and survive in animal organs.

S. enterica is an intracellular bacterial pathogen that can cause persistent infections in humans and livestock. The serovar Typhimurium has been extensively studied in murine models in which the pathogen causes either acute or chronic infections. In the animal, *S. Typhimurium* targets preferentially macrophages, but can also infect other cell types like fibroblasts, where this pathogen attenuates its intracellular growth rate. The aim of this work was to determine the possible role of *S. Typhimurium* TA modules during the infection and survival within eukaryotic cells. Twenty-seven putative TA modules were identified using different bioinformatic approaches. Functional assays, based on the growth inhibition caused by the toxin and the neutralization of this effect by the antitoxin, showed that 18 TA modules were *bona fide* systems. It was observed that some TA modules are expressed by intracellular bacteria during fibroblast but not epithelial cell infection. Moreover, only five out of ten TA systems for which defective mutants were generated showed a clear reduction in the survival ability of intracellular *S. Typhimurium* in the fibroblast infection model, whereas only one showed such phenotype in epithelial cells. These data argue for a possible specialization of selected groups of toxins controlling bacterial survival in distinct host cell types.

ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS	5
LISTADO DE TABLAS	7
LISTADO DE TABLAS EN ANEXOS	7
LISTADO DE ABREVIATURAS	8
INTRODUCCIÓN	11
<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium como patógeno bacteriano intracelular...</i>	13
<i>El género Salmonella</i>	13
<i>Patogénesis por Salmonella Typhimurium: vía de infección y células diana</i>	14
<i>Factores de virulencia de S. Typhimurium</i>	17
<u>Islas de Patogenicidad</u>	17
<u>Plásmido de virulencia</u>	18
<u>Otros factores de virulencia cromosómicos</u>	18
<i>Vida intracelular de S. Typhimurium en el interior de células eucariotas: proliferación frente a bacteriostasis</i>	19
<i>Comparativa entre S. enterica y S. bongori: claves moleculares de la especialización a la vida intracelular</i>	20
<i>Sistemas Toxina-Antitoxina</i>	21
<i>¿Qué es un sistema toxina-antitoxina?: Estructura, tipos y mecanismos de acción</i>	21
<i>Contribución de los sistemas TA a la fisiología bacteriana</i>	26
<u>Sistemas TA y su participación en infección</u>	27
OBJETIVOS.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS	37
<i>Materiales</i>	39
<i>Estirpes bacterianas</i>	39
<i>Construcción de los plásmidos pAC-P_{lac} y pFUS-P_{Ara}</i>	40
<i>Oligonucleótidos</i>	41
<i>Bacteriófagos</i>	41
<i>Medios de cultivo microbiológico</i>	41
<i>Medios de cultivo de líneas celulares eucariotas</i>	43
<i>Soluciones tampón y otras disoluciones</i>	44
<i>Métodos</i>	46

<i>Conservación de células eucariotas</i>	46
<i>Genética bacteriana</i>	46
<u>Clonación de genes codificantes de toxinas y antitoxinas</u>	46
<u>Inactivación de genes cromosómicos y plasmídicos</u>	47
<u>Etiquetado de proteínas en <i>S. Typhimurium</i></u>	49
<u>Transformación de <i>S. Typhimurium</i>: método del CaCl₂ y electroporación</u>	49
<u>Obtención de lisados de bacteriófagos P22</u>	49
<u>Transducción en medio líquido</u>	50
<i>Extracción y manipulación de ácidos nucleicos</i>	50
<u>Aislamiento de ADN plasmídico</u>	50
<u>Aislamiento de ADN genómico</u>	50
<u>Extracción de ARN</u>	51
<u>Reacción en cadena de la polimerasa</u>	51
<u>PCR cuantitativa en tiempo real</u>	51
<u>Secuenciación de ADN</u>	52
<i>Infección de células eucariotas con <i>S. Typhimurium</i></i>	52
<u>Determinación de la tasa de invasión e índice de proliferación</u>	52
<u>Extracción de bacteria intracelular para la purificación de ARN o proteína</u>	53
<i>Preparación y manipulación de muestras de proteínas</i>	53
<u>Preparación de extractos totales de proteínas e inmunodetección por anticuerpos</u>	53
<u>Inducción y detección de la expresión de toxinas y antitoxinas</u>	54
<i>Microscopía óptica: obtención y fijación de muestras</i>	54
<i>Espectrometría de masas: análisis proteómico</i>	55
<i>Ensayos de toxicidad y neutralización</i>	56
<i>Herramientas y procedimientos informáticos</i>	57
<u>Búsqueda e identificación de genes codificantes de toxinas y antitoxinas en el genoma de <i>S. Typhimurium</i> SL1344</u>	57
<u>Análisis genómico comparativo entre <i>S. Typhimurium</i> SL1344 y <i>S. bongori</i></u>	60
<u>Análisis estadístico de los datos</u>	61
<u>Comparación de secuencias de proteínas</u>	61
<u>Análisis y comparación de secuencias de ADN</u>	61
<u>Análisis de los datos de proteómica</u>	61
RESULTADOS	63
<i>Identificación de sistemas toxina-antitoxina en el genoma de <i>S. Typhimurium</i> SL1344</i>	65

S. Typhimurium SL1344 contiene un elevado número de sistemas TA funcionales.....	68
<i>Análisis de la pérdida de actividad en determinadas toxinas y antitoxinas de S. Typhimurium</i>	<i>72</i>
<u>La ausencia de toxicidad o neutralización no se debe a un problema en los clones seleccionados</u>	<u>73</u>
<u>La ausencia de función de algunas toxinas se debe a mutaciones puntuales.....</u>	<u>73</u>
<u>La ausencia de función de algunos sistemas no se debe a una ausencia de expresión</u>	<u>80</u>
<u>La expresión de algunas toxinas no funcionales de posibles sistemas TA altera la morfología de S. Typhimurium</u>	<u>81</u>
S. Typhimurium posee un repertorio de sistemas TA más amplio que la especie no patógena emparentada S. bongori.....	83
Inducción selectiva en S. Typhimurium de determinados sistemas TA en el interior de células eucariotas	85
S. Typhimurium expresa sistemas TA tipo II en el interior de fibroblastos.....	85
S. Typhimurium induce la expresión de tres toxinas de sistemas TA tipo I en el interior de fibroblastos	88
S. Typhimurium aumenta la expresión de un menor número de sistemas TA tipo II en células epiteliales .	89
Contribución de sistemas TA a la supervivencia de S. Typhimurium en el interior de fibroblastos y células epiteliales	91
<i>La baja supervivencia en fibroblastos mostrada por algunos mutantes de S. Typhimurium carentes de sistemas TA se debe a la eliminación del módulo TA y no al procedimiento genético de delección empleado</i>	<i>93</i>
<u>Sistema vapBC2_{ST} del plásmido de virulencia.....</u>	<u>93</u>
<u>Sistema ta4_{ST} cromosómico.....</u>	<u>93</u>
<i>Los mutantes carentes de sistemas TA de S. Typhimurium con baja tasa de supervivencia intracelular no muestran defecto en la invasión de fibroblastos en cultivo</i>	<i>95</i>
<i>La baja supervivencia intracelular de los mutantes carentes de de sistemas TA no se relaciona con cambios en su capacidad de crecimiento en medios de laboratorio.....</i>	<i>95</i>
<i>Los sistemas TA de S. Typhimurium importantes para la supervivencia en fibroblastos humanos son también importantes para la supervivencia en otro tipo de fibroblastos</i>	<i>97</i>
Los sistemas TA que contribuyen a la supervivencia intracelular de S. Typhimurium en fibroblastos no actúan sinérgicamente	98
DISCUSIÓN	101
La cepa SL1344 de Salmonella enterica serovar Typhimurium posee 18 sistemas toxina-antitoxina funcionales.....	103
S. Typhimurium SL1344 posee un mayor número de sistemas TA que la especie no patógena S. bongori	106

<i>Inducción de toxinas de sistemas TA por S. Typhimurium SL1344 en el interior de células eucariotas</i>	107
<i>Efecto de sistemas TA en la adaptación de S. Typhimurium al estilo de vida intracelular en fibroblastos y células epiteliales</i>	109
<i>Los sistemas TA de S. Typhimurium que contribuyen a la supervivencia intracelular no actúan sinérgicamente</i>	114
<i>Modelo de participación de los sistemas TA de S. Typhimurium en la adaptación a la vida intracelular</i>	115
CONCLUSIONES	117
BIBLIOGRAFÍA.....	121
ANEXOS.....	137

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de invasión del epitelio intestinal por *S. Typhimurium*.

Figura 2. Esquema simplificado del funcionamiento de un sistema toxina-antitoxina (TA)

Figura 3. Estructura de los distintos tipos de sistemas TA clasificados en función de la naturaleza y modo de acción de la antitoxina.

Figura 4. Dianas celulares de las toxinas de sistemas TA.

Figura 5. Esquema del procedimiento seguido para la delección de los sistemas TA.

Figura 6. Identificación de 27 posibles sistemas TA en el genoma de *S. Typhimurium* SL1344.

Figura 7. Vectores diseñados para la expresión selectiva de los genes codificantes de toxinas y antitoxinas.

Figura 8. Ensayos funcionales demostraron que 18 de los 27 sistemas TA identificados en el genoma de *S. Typhimurium* SL1344 son funcionales.

Figura 9. La expresión de la toxina VapC_{ST} de *S. Typhimurium* SL1344 da lugar a la aparición de colonias más pequeñas y menos mucosas.

Figura 10. La ausencia de toxicidad en CcdB_{ST} se debe a una sustitución W99R en el aminoácido 99.

Figura 11. La ausencia de toxicidad en PasT_{ST} de *S. Typhimurium* se debe en parte, a cambios en la secuencia de aminoácidos en su región N-terminal.

Figura 12. La toxina IbsB_{ST} de *S. Typhimurium* SL1344 no conserva la estructura típica de los sistemas Ibs.

Figura 13. Alineamiento de secuencia entre las proteínas HigB de *E. coli* (parte superior) y HigB_{ST} de *S. Typhimurium* SL1344 (parte inferior).

Figura 14. Alineamiento de secuencia de la toxina SymE de *E. coli* (parte superior) y SymE_{ST} de *S. Typhimurium* SL1344 (parte inferior).

Figura 15. Alineamiento de secuencia entre las proteínas RelE3 de *S. Dublin* (parte superior) y *S. Typhimurium* SL1344 (parte inferior).

Figura 16. La ausencia de actividad tóxica o neutralizante de toxinas y antitoxinas no se debe a una ausencia de expresión de las proteínas.

Figura 17. Cambios en la morfología de *S. Typhimurium* causados por la expresión de toxinas no funcionales.

Figura 18. *S. Typhimurium* SL1344 posee un mayor número de módulos TA que la especie no patógena *S. bongori*.

Figura 19. *S. Typhimurium* induce la expresión de algunas toxinas de sistemas TA tipo II en el interior de fibroblastos.

- Figura 20.** *S. Typhimurium* induce la expresión selectiva de toxinas pertenecientes a sistemas TA tipo I en el interior de fibroblastos.
- Figura 21.** Expresión diferencial de toxinas de sistema TA tipo II en *S. Typhimurium* que prolifera en el interior de células epiteliales HeLa.
- Figura 22.** La supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* es regulada por un grupo reducido de sistemas TA.
- Figura 23.** Experimento control demostrativo de que el sistema *vapBC2_{ST}* es necesario para la supervivencia de *S. Typhimurium* en fibroblastos BJ-5ta.
- Figura 24.** Experimento control demostrativo de que el sistema *ta4_{ST}* es necesario para la supervivencia de *S. Typhimurium* en fibroblastos BJ-5ta.
- Figura 25.** Ausencia de fenotipo en tasa de invasión en los mutantes en sistemas TA con supervivencia intracelular reducida.
- Figura 26.** Crecimiento en medio LB de los mutantes de *S. Typhimurium* que carecen de los sistemas TA necesarios para la supervivencia intracelular en células eucariotas.
- Figura 27.** Contribución de los sistemas TA a la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en fibroblastos de rata NRK-49F.
- Figura 28.** La delección de múltiples sistemas TA no produce un efecto aditivo en la pérdida de supervivencia en fibroblastos.

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Estirpes bacterianas y plásmidos originales usados en este trabajo.

Tabla 2. Concentración de inductores empleados en los ensayos de toxicidad y neutralización.

Tabla 3. Componentes de los distintos sistemas TA empleados para la búsqueda iterativa por PSI-BLAST.

Tabla 4. Características de los 27 posibles sistemas TA codificados en el genoma de la estirpe *S. Typhimurium* SL1344.

Tabla 5. Toxinas y antitoxinas de sistemas TA de *S. Typhimurium* TA detectadas por espectrometría de masas.

LISTADO DE ANEXOS

Anexo I. Listado de plásmidos recombinantes construidos durante esta Tesis Doctoral.

Anexo II. Oligonucleótidos usados en esta Tesis Doctoral.

Anexo III. Secuencias de aminoácidos de las proteínas usadas en la identificación proteómica de toxinas y antitoxinas.

LISTADO DE ABREVIATURAS

AAA+	ATPasa asociada con varias actividades celulares (<i>"ATPases Associated with diverse cellular Activities"</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNt	ARN de transferencia
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
ADNasa	Desoxirribonucleasa
ARNasa	Ribonucleasa
dNTP	Desoxinucleósido trifosfato
DO₆₀₀	Densidad óptica medida a una longitud de onda de 600 nm
EDTA	Ácido etilén-diamino tetra-acético
HA	Epítipo de hemaglutinina
6xHis	Epítipo de 6 histidinas
IL	Interleuquina
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
Kb	Kilobase
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
MEM	Medio mínimo esencial
NRK-49F	Fibroblastos de riñón de rata (<i>"normal rat kidney fibroblasts"</i>)
NTS	Salmonelosis no tifoidea (<i>"Nontyphoidal Salmonellosis"</i>)
oriC	Origen de replicación del cromosoma
pb	Par de bases
PBS	Solución tamponada de fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT	Transcripción reversa
SCFP	Proteína fluorescente cian
SCV	Vacuola que contiene a <i>Salmonella</i> (<i>"Salmonella-containing vacuole"</i>)
SD	Secuencia de unión del ribosoma Shine-Dalgarno
SDS	Dodecil sulfato sódico

SIFs	Filamentos inducidos por Salmonella (" <i>Salmonella-induced filaments</i> ")
SPI	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i> (" <i>Salmonella-pathogenicity island</i> ")
TA	Toxina-antitoxina
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano
Western blot	Ensayo de transferencia de proteínas a membrana seguida de detección de proteínas específicas por anticuerpos

INTRODUCCIÓN

***Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovar Typhimurium como patógeno bacteriano intracelular**

El género Salmonella

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, compuesta por bacterias Gram-negativas, flageladas, anaerobias facultativas y con ciclos de vida que incluyen, en general, interacción con un organismo hospedador al que infectan (Winfield y Groisman, 2003). Este género contiene dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. *S. enterica* se divide a su vez en seis subespecies: I (*enterica*), II (*salamae*), IIIa (*arizonae*), IIIb (*diarizonae*), IV (*houtenae*) y V (*indica*) (Tindall y col., 2005, Grimont y Weill, 2007). La especie *S. enterica* engloba más de 2.500 serogrupos clasificados en base a sus antígenos O (lipopolisacárido) y H (flagelo) (Grimont y Weill, 2007). La subespecie I de *S. enterica* contiene más de 1.500 serovares, y está compuesta por patógenos que causan enfermedad en animales endotermos, entre los cuales se incluye el ser humano (Grimont y Weill, 2007). Estas patologías van desde una leve diarrea y dolor abdominal, consecuencia de la inflamación de la mucosa intestinal, a enfermedades sistémicas más graves como septicemia (Bäumler y col., 2011). El resto de subespecies de *S. enterica* infectan a organismos ectotermos. La otra especie del género *Salmonella*, *S. bongori*, se considera el representante no patógeno del género (Fookes y col., 2011), aunque se han descrito unos pocos casos de infección por dicha especie (Giammanco y col., 2002, Nastasi y col., 1988). Siguiendo la norma comúnmente adoptada, se simplificará la nomenclatura de los serovares como sigue: *Salmonella* Typhimurium en lugar de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovar Typhimurium.

En base a análisis de secuencia basados en relojes moleculares¹, el género *Salmonella* divergió de un ancestro común de *Escherichia coli* hace 100 millones de años (Doolittle y col., 1996). Durante este tiempo, cambios en su genoma ligados a la adquisición de mutaciones y la transferencia génica horizontal, habrían llevado a la especiación y adaptación de *Salmonella* a nuevos nichos (McClelland y col., 2000). Aunque existen variantes patógenas de *E. coli*, se considera un organismo comensal del bajo intestino de animales endotermos (Smith, 1965). En este ambiente, *E. coli* reside y prolifera gracias a un entorno caracterizado por una temperatura y aporte de nutrientes constantes (Savageau, 1974, Chung y col., 1979). Por su parte, los miembros de la subespecie I de *S. enterica*, son patógenos adaptados a organismos endotermos (Bäumler, 1997). Los distintos serovares de esta

¹ El término de reloj molecular fue acuñado por Emile Zuckerkandl y Linus Pauling en un trabajo de 1962. En él, estos autores dataron el origen de globinas pertenecientes a distintas especies en base a la secuencia de aminoácidos. La idea de que la evolución a nivel molecular ocurre a una tasa aproximadamente uniforme a lo largo del tiempo, se conoce como hipótesis del reloj molecular (Zuckerkandl y Pauling, 1962, Kumar, 2005).

INTRODUCCIÓN

subespecie se adaptan a multitud de hospedadores, incluyendo pollos y pavos (Zhao y col., 2001, Rodríguez y col., 2006, Braden, 2006), terneros (Rothenbacher, 1965, Sojka y col., 1977), cerdos (Berends y col., 1996, Carnell y col., 2007) o reptiles (Pasmans y col., 2005, Bemis y col., 2007). Diferentes serovares se diseminan por varios hospedadores sin causar enfermedad, hasta colonizar el organismo al que se encuentran mejor adaptado, aumentando así las posibilidades de dispersión y supervivencia de *Salmonella* como patógeno (Kingsley y Bäumlér, 2000, Callaway y col., 2008). Determinados serovares de la subespecie I, como *Salmonella* Typhi o *Salmonella* Paratyphi, se han adaptado a un número de hospedadores muy limitado (ser humano y primates superiores). Por el contrario, otros serovares de esta misma subespecie, como *Salmonella* Enteritidis o *S.* Typhimurium, infectan una amplia gama de animales (Kingsley y Bäumlér, 2000).

La vía más frecuente de contaminación por *Salmonella* en seres humanos es fundamentalmente la ingestión de alimentos procedentes de animales contaminados como carne no cocinada y huevos. Tienen también su importancia la verdura y fruta tratadas con aguas contaminadas (Callaway y col., 2008). La contaminación con heces procedentes de animales o seres humanos infectados, así como de aguas contaminadas, facilita la diseminación de *Salmonella* a través de un contacto fecal-oral más directo.

Patogénesis por Salmonella Typhimurium: vía de infección y células diana

Según la Organización Mundial de la Salud y el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades estadounidense, *S.* Typhimurium y *S.* Enteritidis son los serovares del género *Salmonella* más frecuentemente aislados en clínica (CDC, 2013). Ambos serotipos son causantes de salmonelosis no tifoidea ("*nontyphoidal Salmonellosis*"- NTS). En pacientes inmunocompetentes, los serovares causantes de NTS dan lugar a diarrea (generalmente limitante y no invasiva) acompañada de dolor abdominal, náuseas y vómitos, que rara vez suponen un grave riesgo para la salud, por lo que no se suele prescribir el tratamiento con antibióticos (Coburn y col., 2007). Únicamente en porcentaje inferior al cinco por ciento de los pacientes, la infección por NTS traspasa el tracto digestivo y da lugar a bacteriemia. Un fenómeno añadido es la colonización asintomática del individuo una vez superada la enfermedad, hecho que facilita la dispersión del patógeno (Thompson y col., 2009, Crawford y col., 2010).

Se ha estimado en aproximadamente 5×10^4 el número de bacterias necesarias para causar una infección tras la ingestión de *S.* Typhimurium en aguas y alimentos. El tiempo de incubación transcurre entre 6-72 h dependiendo de la susceptibilidad del hospedador y el número de bacterias ingeridas (Wray y Sojka, 1978). En su camino hacia el intestino *S.* Typhimurium se enfrenta al pH ácido del estómago activando respuestas que aseguran el mantenimiento de un pH fisiológico en su

interior (Foster y Hall, 1991). En el intestino delgado, *S. Typhimurium* atraviesa la mucosa que separa el lumen del epitelio intestinal y contacta con los enterocitos² (Figura 1). Aunque *S. Typhimurium* infecta activamente enterocitos, la penetración de la barrera intestinal se produce principalmente por las células M³, localizadas en las placas de Peyer (Jones y col., 1994). En su interacción con esta célula diana, *S. Typhimurium* inyecta, a través de sistemas de secreción tipo III⁴ (Galán y Collmer, 1999), diversos efectores que dan lugar a una reestructuración del citoesqueleto celular, y a un incremento de la movilidad de la membrana citoplasmática (McGhie y col., 2009). Este proceso provoca la internalización de la bacteria en una vacuola especializada denominada “*Salmonella containing vacuole*” o SCV (García-del Portillo y Finlay, 1994). En el interior de las células M o enterocitos, la bacteria englobada en la SCV se desplaza hasta la membrana basolateral. Tras culminar este fenómeno de transcitosis, *S. Typhimurium* es fagocitada por células del sistema inmune como macrófagos o células dendríticas (Figura 1). *S. Typhimurium* podría utilizar los macrófagos como vehículo para su propagación a través de la sangre hasta órganos diana como bazo e hígado, en los que prolifera activamente (Vázquez-Torres y col., 1999).

Tras la invasión de la célula eucariota, la SCV se integra en la ruta fagocítica, destinada a la fusión con lisosomas contenedores de enzimas capaces de eliminar a la bacteria. *S. Typhimurium* interrumpe parcialmente esta fusión mediante la translocación de diversas proteínas efectoras en el hospedador (García-del Portillo y Finlay, 1995, Steele-Mortimer, 2008, Figueira y Holden, 2012). Desde la SCV, *S. Typhimurium* induce la formación de una red de filamentos de actina, que engloban y ayudan al mantenimiento estructural de esta vacuola (Meresse y col., 2001). La SCV migra posteriormente a una localización perinuclear en estrecho contacto con el aparato de Golgi, para regular el tráfico vesicular y asegurarse el aporte de nutrientes y membranas que necesita (Salcedo y Holden, 2003, Deiwick y col., 2006). En células epiteliales, *S. Typhimurium* induce además la formación de largos filamentos denominados SIFs (del inglés *Salmonella-Induced Filaments*) que parten desde la SCV y se extienden a lo largo de la célula (García-del Portillo y col., 1993b). La función de estas complejas estructuras, ricas en glicoproteínas de membrana lisosomales, podría estar relacionada también con la captación de nutrientes (García-del Portillo y col., 1993a, Rajashekar y col., 2008).

² Células epiteliales especializadas del intestino encargadas de la captación de nutrientes.

³ Las células M (de “*Micropliegues*”) se encuentran en las placas de Peyer o tejido linfoide asociado a mucosas. A diferencia de las células epiteliales que recubren el intestino, las células M carecen de microvellosidades, aunque sí poseen micropliegues en su superficie, de ahí su nombre. Las células M se encuentran en agrupaciones de tejido linfoide no encapsulado situadas en la lámina propia y área submucosa. Estas células especializadas absorben y transportan antígenos, que son procesados y presentados a las células linfoides subepiteliales.

⁴ Sistema de secreción tipo III: complejo macromolecular en forma de aguja que *Salmonella* utiliza para introducir efectores en el hospedador (Galán y Collmer, 1999).

INTRODUCCIÓN

A diferencia de la patología observada en hospedadores como vacas, pollos o incluso en el ser humano, *S. Typhimurium* produce en ratones una enfermedad sistémica similar a la fiebre tifoidea causada por *S. Typhi* en humanos (Monack y col., 2000). Este modelo animal ha permitido identificar las células diana que *Salmonella* es capaz de infectar, así como los múltiples efectores y reguladores necesarios para el establecimiento temprano y progresión de la infección (Fábrega y Vila, 2013). Además, el uso de líneas celulares *ex vivo* facilita el estudio de los mecanismos que *Salmonella* emplea durante la invasión y supervivencia intracelular (Garai y col., 2012).

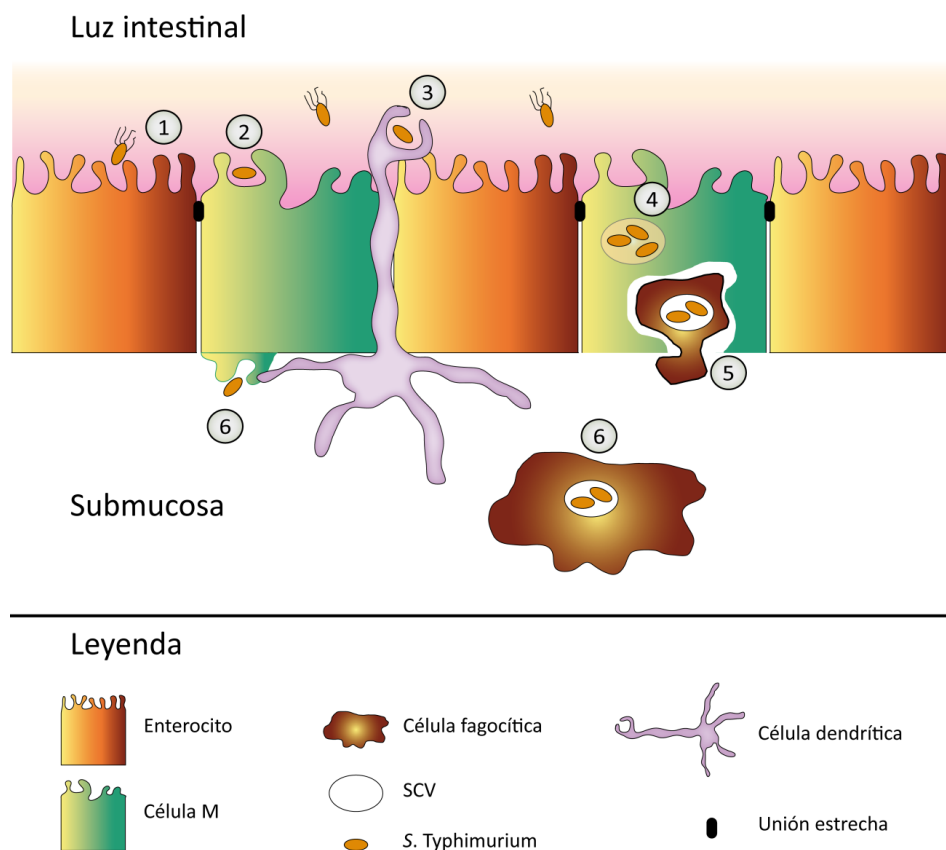


Figura 1. Modelo de invasión del epitelio intestinal por *S. Typhimurium*. 1, la bacteria se adhiere al epitelio intestinal empleando moléculas de superficie como las adhesinas. 2, tras la inyección de factores de virulencia por sistemas de secreción tipo III, *S. Typhimurium* altera la dinámica del citoesqueleto de la célula eucariota (especialmente el de actina), para promover la internalización de la bacteria. 3, en una ruta alternativa, la bacteria puede ser captada directamente en el lumen por las células dendríticas residentes en la submucosa. 4, tras su internalización *S. Typhimurium* se localiza en una vacuola (SCV). 5, la SCV se desplaza hacia la membrana basolateral, donde puede liberar las bacterias que contiene hacia la submucosa. 6, finalmente, las bacterias liberadas a la submucosa son captadas por células fagocíticas. Modificado de (Sansonetti, 2002).

Factores de virulencia de S. Typhimurium

S. Typhimurium utiliza distintos mecanismos para invadir las células diana, captar nutrientes y suprimir la respuesta inmune. La mayoría de los factores implicados en estas respuestas aparecen codificados en cinco islas de patogenicidad ("*Salmonella-Pathogenicity Islands*" o SPIs), existiendo otros codificados en el plásmido de virulencia pSLT y el cromosoma (Fábrega y Vila, 2013). Los factores de virulencia más estudiados se han relacionado con la reorganización del citoesqueleto en la célula infectada, la modulación del tráfico de la SCV y la defensa al ataque de la célula fagocítica.

Islas de Patogenicidad ("*Salmonella-pathogenicity island*", SPI)

Las SPI son regiones del genoma ausentes en bacterias no patógenas filogenéticamente próximas, donde se concentran agrupaciones génicas relacionadas con la virulencia. SPI-1 y SPI-2 son las más importantes, por ser las que codifican el mayor número de proteínas efectoras y/o reguladoras del proceso infeccioso. Las SPIs más estudiadas e importantes en la virulencia de *S. Typhimurium* son:

- **SPI-1:** sus genes codifican diversos reguladores transcripcionales, proteínas estructurales y proteínas efectoras que inducen la internalización de la bacteria en la célula eucariota, vía alteración de la dinámica del citoesqueleto de actina. La "inyección" de las proteínas efectoras (operón *sic/sip*) en la célula eucariota se produce por un canal incluido en una estructura macromolecular denominada "complejo aguja o jeringa" (operón *prg/org*). En su extremo se disponen proteínas que facilitan el contacto y apertura de un poro en la membrana de la célula eucariota para la translocación de las proteínas efectoras (operón *sipBCD*). De forma similar a la secreción tipo III de algunas proteínas del flagelo, las proteínas efectoras de esta y otras islas de patogenicidad no son procesadas durante el proceso de secreción. (Lostro y Lee, 2001).
- **SPI-2:** codifica las proteínas implicadas en la reducción de tetrionato⁵, importante en la colonización intestinal (Winter y col., 2010), y los componentes implicados en la síntesis de un segundo sistema de secreción tipo III. SPI-2 es especialmente importante para la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* una vez ha atravesado la membrana citoplasmática y se encuentra en la SCV (Ochman y col., 1996, Kuhle y Hensel, 2004).

⁵ Las bacterias comensales del intestino producen abundante H₂S, compuesto tóxico que es neutralizado y convertido a tiosulfato por la mucosa intestinal. Durante la infección, *S. Typhimurium* induce inflamación intestinal, en la que los neutrófilos liberan especies reactivas de oxígeno. Dichas moléculas interactúan con el tiosulfato generando tetrionato. Gracias a las proteínas codificadas en la SPI-2, *S. Typhimurium* es capaz de usar tetrionato como aceptor de electrones. Esto es especialmente ventajoso en el ambiente anaerobio del intestino, donde *Salmonella* debe competir con el resto de flora comensal fermentadora (Winter y col., 2010).

INTRODUCCIÓN

- **SPI-3:** codifica proteínas implicadas en la adhesión inicial de la bacteria a las células diana, y factores implicados en la supervivencia y diseminación sistémica de la bacteria (Blanc-Potard y col., 1999, Dorsey y col., 2005).
- **SPI-4:** contiene seis genes localizados en un sólo operón, que codifican factores implicados en la interacción del patógeno con el epitelio intestinal y su supervivencia en macrófagos (Morgan y col., 2004, Gerlach y col., 2007).
- **SPI-5:** La principal proteína efectora codificada en esta isla de patogenicidad es SigD. Es una proteína multifuncional implicada en diversos procesos de la patogénesis como invasión de células epiteliales e inhibición de la muerte celular (apoptosis) en este tipo celular (Hernández y col., 2004, Knodler y col., 2005, Patel y Galán, 2006). SigE, codificada en el mismo operón que SigD, actúa como chaperona asociada a esta proteína efectora (Hong y Miller, 1998).

Plásmido de virulencia

Determinados serovares de la subespecie I de *S. enterica*, poseen plásmidos de 50-90 Kb (dependiendo del serovar) que codifican factores de virulencia. Aunque varían en tamaño, todos ellos poseen una región común bien conservada de 8 Kb, en la que se encuentra el operón *spvRABCD* (Rotger y Casadesus, 1999). *spvR* codifica un regulador de la transcripción, mientras que *spvB* y *spvC* codifican las dos únicas proteínas efectoras descritas en este plásmido. SpvB interviene en la reorganización del citoesqueleto de actina que promueve la formación de los SIFs y la estabilización de la SCV (Lesnick y col., 2001). SpvC atenúa el proceso inflamatorio gracias a la inhibición de rutas celulares que disparan la producción de citoquinas proinflamatorias (Mazurkiewicz y col., 2008, Haneda y col., 2012). Estos plásmidos específicos de serovar portan además los genes *pef*, que codifican las proteínas implicadas en la formación de fimbrias. Estas estructuras son importantes para la adhesión de la bacteria a las células eucariotas (Bäumler y col., 1996) y la formación de biopelículas (Ledeboer y col., 2006), comunidades microbianas especialmente importantes en infecciones crónicas (González-Escobedo y Gunn, 2013).

Además de estos plásmidos específicos de serovar, se han identificado en muchos aislados otros plásmidos que contienen genes de resistencia a antibióticos (Herrero y col., 2008, Harmer y col., 2014, Kubasova y col., 2014).

Otros factores de virulencia cromosómicos

Durante el proceso infeccioso, *S. Typhimurium* utiliza también factores codificados en genes cromosómicos. Estos factores de virulencia están relacionados, entre otros procesos, con

quimiotaxis, adhesión a la célula diana y formación de estructuras como fimbrias y flagelos (Fábrega y Vila, 2013).

Vida intracelular de S. Typhimurium en el interior de células eucariotas: proliferación frente a bacteriostasis

S. Typhimurium sobrevive en el interior de una vacuola, la SCV, en tipos celulares fagocíticos y no fagocíticos (Tierrez y García-del Portillo, 2005). El modelo *ex vivo* de células epiteliales, el cual asemeja en muchos aspectos la infección temprana de los enterocitos en el epitelio intestinal, muestra que la bacteria prolifera activamente en su interior (Martínez-Moya y col., 1998). De hecho, esta proliferación escapa incluso de la SCV, habiéndose detectado una población de bacterias que se multiplica activamente en el citoplasma de la célula epitelial (Malik-Kale y col., 2012). En macrófagos, *Salmonella* induce apoptosis manteniendo la integridad de las membranas de la célula infectada, con lo que evita la liberación de moléculas proinflamatorias, que atraerían a células del sistema inmune (Fink y Cookson, 2007). Este mecanismo es dependiente de caspasa-3⁶, el efector SpvB, codificado en el plásmido de virulencia, y el efector SlrP, codificado en el cromosoma (Bernal-Bayard y Ramos-Morales, 2009, Bernal-Bayard y col., 2010).

Una vez se ha producido la penetración de la barrera intestinal, *S. Typhimurium* contacta con células del sistema fagocítico, como monocitos o células dendríticas (Sansonetti, 2002). A diferencia de otros tipos celulares, los macrófagos pueden combatir activamente la infección por bacteria intracelular a través de diversos mecanismos, incluyendo la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Vázquez-Torres y col., 2000) o péptidos antimicrobianos (Ganz, 2003). Esta respuesta limita la proliferación de la bacteria intracelular. *S. Typhimurium* puede contrarrestar este ataque induciendo la muerte del macrófago por mecanismos como el de piroptosis⁷ (van der Velden y col., 2000). Este fenómeno facilita la dispersión de la bacteria a células vecinas, y su transporte junto a restos celulares que son posteriormente fagocitados (Guiney, 2005). Efectores como SpvB

⁶ Las caspasas son una familia de proteasas implicadas en la muerte celular programada (Creagh y col, 2003).

⁷ Existen varios tipos de muerte celular, entre las que se encuentran la apoptosis y la piroptosis. Mientras que en la apoptosis participan varias caspasas, la piroptosis es únicamente dependiente de caspasa-1. La caspasa-1 está implicada en el procesamiento/activación de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18 (Fantuzzi y Dinarello, 1999). La activación de caspasa-1 en macrófagos infectados por *Salmonella*, da lugar al procesamiento de estas citoquinas y a la muerte de la célula eucariota (Hersh y col, 1999, Brennan y Cookson, 2000). Durante la apoptosis se produce una condensación nuclear y citoplasmática, y una fragmentación de la célula, de manera que los restos celulares quedan englobados por membranas, no liberándose componentes celulares al medio. Por el contrario, en la muerte celular por piroptosis la lisis de la célula libera componentes celulares, muchos de ellos con carácter proinflamatorio. En este sentido, el mecanismo y resultado de este tipo de muerte celular es completamente diferente a la apoptosis, en la que existe una inhibición activa del proceso inflamatorio.

(Libby y col., 2000) o SipB (Hersh y col., 1999) se han relacionado con muerte celular en macrófagos, la cual es dependiente de caspasa-1 y conduce a la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-18 e IL-1 β .

Existen indicios de que el fibroblasto podría actuar como célula reservorio durante la infección del intestino por *S. Typhimurium* (Boyle y col., 2007). Este tipo celular se encuentra ampliamente distribuido en la lámina propia, donde modula la movilidad, diferenciación y proliferación de las células epiteliales (Powell y col., 1999a, Powell y col., 1999b). El fibroblasto es además un tipo celular ampliamente distribuido por la mayoría de los tejidos, y en muchos casos en estrecho contacto con células del sistema inmune (Sorrell y Caplan, 2009). Complementariamente, se ha demostrado en modelos de infección de líneas celulares, que *S. Typhimurium* invade y sobrevive por largos periodos de tiempo en el interior de fibroblastos (Cano y col., 2001, García-del Portillo, 2001, Cano y col., 2003). Durante la colonización del fibroblasto, *S. Typhimurium* muestra en su interior una baja tasa de proliferación (Martínez-Moya y col., 1998). La bacteria intracelular atenúa su tasa de crecimiento mediante diversos reguladores, como el sistema de dos componentes PhoP-PhoQ (Cano y col., 2001, Nuñez-Hernández y col., 2013). Esta respuesta, también demostrada en fibroblastos primarios aislados de intestino de ratón (Aiausti y col., 2010), proporciona un modelo de estudio idóneo para analizar los mecanismos de la persistencia de *S. Typhimurium* en el interior de células eucariotas.

Comparativa entre S. enterica y S. bongori: claves moleculares de la especialización a la vida intracelular

Una estrategia rápida y útil para la identificación de factores de virulencia en bacterias es la comparativa genómica entre especies, del mismo o distintos grupos filogenéticos (Zhu y col., 2008, Yang y col., 2008, Eijkelkamp y col., 2014, Georgiades y Raoult, 2011). Además, la comparación del genoma de aislados con distinto grado de virulencia puede proporcionar información sobre “qué ha hecho que la cepa en cuestión sea más patógena” (Zhao y col., 2013, Hendriksen y col., 2014, Leekitcharoenphon y col., 2014). Este tipo de análisis muestra de una forma directa aquellos genes que podría haber adquirido una especie para adaptarse al hospedador (Nuccio y Bäumler, 2014, Zarrineh y col., 2014).

S. bongori es la especie no patógena del género *Salmonella*, estando principalmente asociada a organismos de sangre fría, mientras que las diversas subespecies de *S. enterica* infectan multitud de organismos. Al igual que ocurre con otras especies bacterianas, la divergencia entre *S. bongori* y *S. enterica* a lo largo de la evolución se atribuye principalmente a la transferencia génica horizontal y mutaciones génicas, permitiendo nuevas adaptaciones a diferentes nichos o entornos. En este sentido, el contenido en G+C de *S. bongori* difiere de *S. enterica* (51,2% frente a 52,3%,

respectivamente). Además, *S. bongori* comparte sólo parte del repertorio de factores de virulencia y rutas metabólicas que posee *S. enterica* (Fookes y col., 2011). *S. bongori* posee únicamente 3 de las 22 SPIs que aparecen en *S. enterica*. Una de ellas, la SPI-1, especialmente importante en la patogénesis de esta especie, aparece íntegra y en la misma localización cromosómica en ambas especies, lo cual hace pensar que fue adquirida en una etapa previa a la divergencia de ambas especies. Otras islas de patogenicidad importantes para la supervivencia intracelular de *S. enterica*, como la SPI-2, SPI-3 o SPI-5, bien están ausentes en *S. bongori* (SPI-2) o aparecen incompletas (SPI-3 y SPI-5) (Ochman y Groisman, 1996, Fookes y col., 2011).

Aunque *S. bongori* conserva la mayoría de rutas metabólicas presentes en *S. enterica*, carece de la ruta de síntesis anaeróbica de cobalamina (vitamina B12) y metabolismo de propanodiol (Roth y col., 1996). La síntesis de propanodiol es esencial para la vida intracelular de *S. enterica* en macrófagos, donde *S. bongori* no es capaz de sobrevivir (Hansen-Wester y col., 2004, Klumpp y Fuchs, 2007).

Sistemas Toxina-Antitoxina

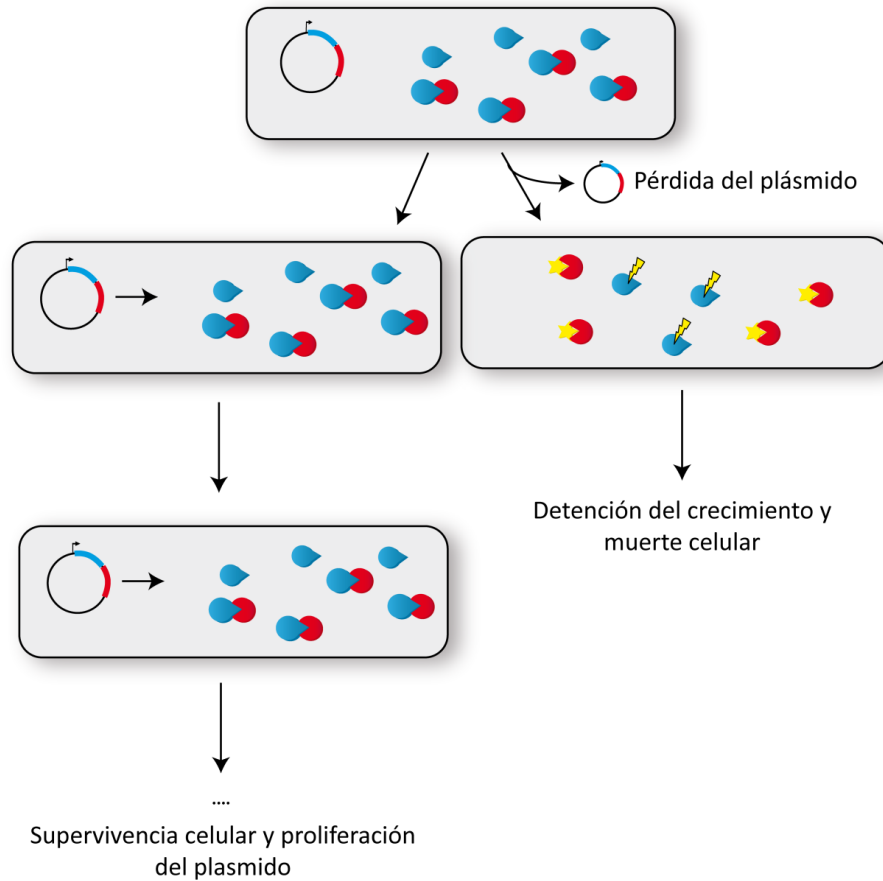
Además de los mecanismos reguladores y proteínas efectoras descritos anteriormente, éstos no son los únicos factores de virulencia implicados en la infección y/o supervivencia de bacterias patógenas. En la presente Tesis Doctoral se quiso estudiar el posible papel de los sistemas toxina-antitoxina como factores de virulencia en la infección por *S. Typhimurium*. Estos sistemas son módulos de respuesta a estrés y reguladores de crecimiento ampliamente extendidos en bacterias y arqueas. Teniendo en cuenta la divergencia adaptativa/evolutiva anteriormente descrita entre *S. enterica* y *S. bongori*, se emplearon los genomas secuenciados de estirpes de estas dos especies para la identificación de posibles sistemas toxina-antitoxina importantes en la infección. En las siguientes secciones se describen las principales características de los sistemas toxina-antitoxina, y cómo estos módulos podrían contribuir a la supervivencia de *S. Typhimurium* durante la infección.

¿Qué es un sistema toxina-antitoxina?: Estructura, tipos y mecanismos de acción

El primer sistema toxina-antitoxina (TA) descrito fue el operón *ccdAB* del plásmido F de *E. coli* (Ogura y Hiraga, 1983). Inicialmente se pensó, que el sistema *ccdAB* acoplaba la multiplicación del plásmido con la división celular. Posteriormente se comprobó, que la estabilización plasmídica era debida a que las células que perdían el plásmido durante la división celular morían (muerte post-segregacional) como resultado de la activación de la toxina CcdB (Jaffe y col., 1985, Gerdes y col., 1986). A raíz de este descubrimiento, a estos sistemas se les denominó “módulos de adicción plasmídica” (Figura 2), por la dependencia que su presencia crea en la célula (Lehnerr y col., 1993, Yarmolinsky, 1995). Desde su descubrimiento, diversos estudios han demostrado la amplia

INTRODUCCIÓN

distribución de estos sistemas, no sólo en plásmidos, sino también en el cromosoma de bacterias y arqueas (Pandey y Gerdes, 2005, Ramage y col., 2009, Fozo y col., 2010, Shao y col., 2011, Sberro y col., 2013).



Leyenda

- Antitoxina
- Toxina
- Bacteria
- Diana de la toxina
- Plásmido que porta el sistema TA
- Genes codificantes de la antitoxina (azul) y la toxina (rojo)
- Proteasas celulares

Figura 2. Esquema simplificado del funcionamiento de un sistema toxina-antitoxina (TA). Se representa un sistema TA codificado en un plásmido. La presencia del plásmido asegura una producción constante de la antitoxina (azul), quedando la toxina (rojo) bloqueada. Sin embargo, la pérdida del plásmido en el que está codificado el sistema TA impide la síntesis de nueva antitoxina, con lo que la toxina, bioquímicamente más estable en la célula, queda libre para atacar su diana celular. Esto provoca la bacteriostasis y/o muerte celular de las bacterias libres de plásmido.

En general, un sistema o módulo TA se define como un operón bicistrónico, que codifica una antitoxina y una toxina, no necesariamente en este orden. Estos módulos presentan algunas características comunes:

i) los genes de la antitoxina y la toxina se encuentran solapados, al menos parcialmente, o muy próximos el uno del otro (Hayes, 2003, Gerdes y col., 2005, Buts y col., 2005).

ii) La antitoxina es bioquímicamente más inestable que la toxina, por lo que es necesaria una producción constante de la primera para mantener silenciada la segunda. Esta cualidad es la que permite actuar a los sistemas TA como módulos de estabilidad y/o adicción. Si la célula que porta el operón (por ejemplo, en un plásmido) lo pierde, la antitoxina es rápidamente degradada (por ARNasas o proteasas según el sistema). Por el contrario la toxina, bioquímicamente más estable, queda libre para atacar su diana celular, provocando un efecto bacteriostático y/o bacteriolítico⁸ (dependiendo del sistema y la situación) en la célula.

iii) La antitoxina actúa comúnmente como autorrepressor del operón. En general, salvo en los sistemas TA tipo I y III (ver más adelante en el texto), la antitoxina cumple una función de represor “débil” incapaz de impedir completamente la transcripción del operón. Las antitoxinas de naturaleza proteica, poseen generalmente dos dominios claramente diferenciados: un dominio N-terminal de interacción con DNA y una región C-terminal necesaria para la interacción y neutralización de la toxina. En ausencia de toxina, las antitoxinas suelen interaccionar con secuencias nucleotídicas discretas en la región promotora operadora del operón TA. Sin embargo, esta unión proteína-ADN es lábil. La interacción antitoxina-toxina permite la formación de un complejo represor completamente funcional, reduciéndose así la transcripción de ambos genes. Este efecto permite mantener unos niveles de toxina en la célula lo suficientemente bajos como para no interferir con el crecimiento normal de ésta, pero lo suficientemente altos como para responder rápidamente ante situaciones en las que el sistema debe activarse (por ejemplo estrés o pérdida de plásmidos). Una excepción a esta regla, y a la estructura general de los sistemas TA, son algunos módulos como $\omega\epsilon\zeta$ del plásmido pSM19035 de *Streptococcus pyogenes* (Zielenkiewicz y Ceglowski, 2005) o el sistema cromosómico *paaR-paaA-parE* de *E. coli* (Hallez y col., 2010). En estos casos, la actividad reguladora como represor transcripcional recae en un tercer componente independiente de toxina y antitoxina. Otro caso particular es el sistema *mazEF* de *Staphylococcus aureus*. En este caso la antitoxina MazE parece haber perdido el dominio N-terminal de unión a ADN típico de las antitoxinas. Este hecho hace que MazE sea incapaz de reprimir el operón. La regulación viene dada por el factor sigma B alternativo, σ^B (Donegan y Cheung, 2009).

iv) Tras actuar sobre sus dianas celulares, las toxinas producen bien una parada en el crecimiento o la muerte celular (Engelberg-Kulka y col., 2006). Esta cualidad crea la adicción de estos módulos en la

⁸ Existe gran controversia en torno a si los sistemas TA pueden inducir muerte celular o no. Se han propuesto dos hipótesis. La primera considera que las toxinas de los sistemas TA producen bacteriostasis y quiescencia en la célula (Gerdes y col., 2005). La segunda, defiende que algunas toxinas producen una muerte altruista en parte de la población, liberando nutrientes necesarios para permitir la supervivencia del resto (Engelberg-Kulka y col., 2006).

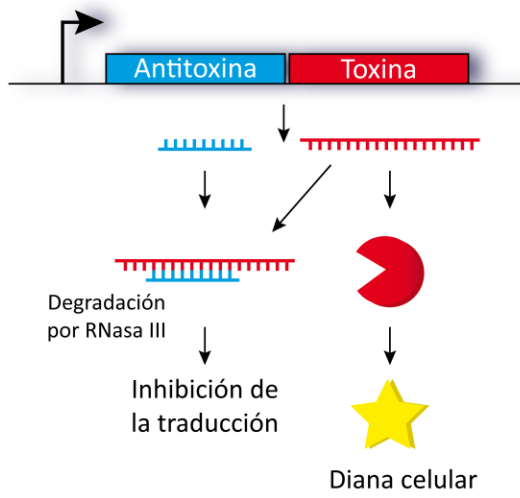
INTRODUCCIÓN

célula, pues la pérdida del sistema TA resulta en un ataque por la toxina. A pesar de este efecto negativo de la adicción, esta toxicidad puede llegar a ser beneficiosa para la célula ante determinadas situaciones de estrés (véase más adelante).

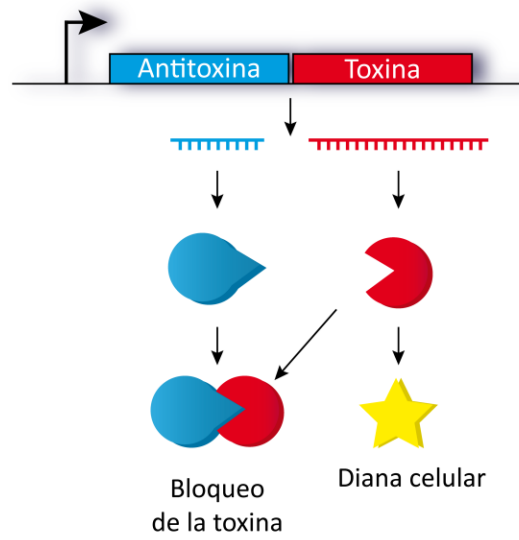
Los sistemas TA se clasifican atendiendo a la naturaleza bioquímica y mecanismo de acción de la antitoxina. Así, podemos distinguir sistemas tipo I, II, III, IV y V (Figura 3). En los sistemas TA tipo I y III, la antitoxina es un ARN, mientras que en el resto (II, IV y V) la antitoxina es una proteína (Wen y col., 2014). Las antitoxinas de los sistemas tipo I son ARNs antisentido que hibridan con el ARNm codificante de la toxina (Gerdes y col., 1986, Fozo y col., 2008a), bloquean la traducción de este ARNm y forman un ARN de doble cadena que es degradado por RNasa III (Gerdes y col., 1992, Franch y col., 1999). En los sistemas TA tipo III la antitoxina es también un ARN, aunque en este caso, la neutralización se produce por una interacción ribo-proteica con la toxina (ARN-proteína), quedando bloqueado el centro catalítico de la toxina (Fineran y col., 2009). En el resto de sistemas (II, IV y V), la antitoxina es una proteína, y al igual que ocurre con los sistemas I y III, la diferencia entre ellos radica en el mecanismo de neutralización. En los sistemas TA tipo II la neutralización tiene lugar por una interacción proteína-proteína entre toxina y antitoxina (Gerdes, 2013, Yamaguchi y Inouye, 2011). En los tipo IV la antitoxina impide la acción de la toxina mediante un bloqueo del sustrato diana (Masuda y col., 2012). Por último, el sistema tipo V *ghoST*, es el único caso descrito hasta la fecha en el que la antitoxina tiene actividad catalítica; es una ARNasa que degrada el ARNm de su toxina e impide así su traducción (Wang y col., 2012). En todos los casos conocidos la toxina siempre es una proteína cuya diana y mecanismo de acción es variable (Yamaguchi y Inouye, 2011). Existen toxinas con actividad ARNasa (Kid, RelE, o MazF), que bloquean la ADN girasa (CcdB y ParE), que inhiben la síntesis de peptidoglicano (ζ y PezT) o la división celular (CbtA). A pesar de todo el abanico de actividades descritas, el proceso celular más afectado por un mayor número de toxinas es el de la traducción del ARNm. El conjunto de estas actividades se esquematizan en la Figura 4.

Figura 3. Estructura de los distintos tipos de sistemas TA clasificados en función de la naturaleza y modo de acción de la antitoxina. De arriba a abajo se esquematizan los sistemas TA tipo I, II, III, IV y V. En los sistemas TA tipo I y III, las antitoxinas son moléculas de ARN; la diferencia radica en el mecanismo de neutralización de la toxina: en los sistemas TA tipo I la molécula de ARN de la antitoxina hibrida con el ARNm que codifica la toxina, con lo que previene su traducción y promueve la degradación del ARN de doble cadena por ARNasa III. En los sistemas TA tipo II, IV y V, la antitoxina es una proteína. Al igual que en el caso de los tipos I y III, la diferencia radica en el mecanismo de neutralización: **i)** en los sistemas TA tipo II la antitoxina bloquea la toxina por una interacción proteína-proteína; **ii)** las antitoxinas de los sistemas TA tipo IV bloquean la diana de la toxina, impidiendo que ésta ejerza su efecto tóxico; **iii)** en los sistemas TA tipo V la antitoxina es una ARNasa que degrada el ARNm que codifica la toxina.

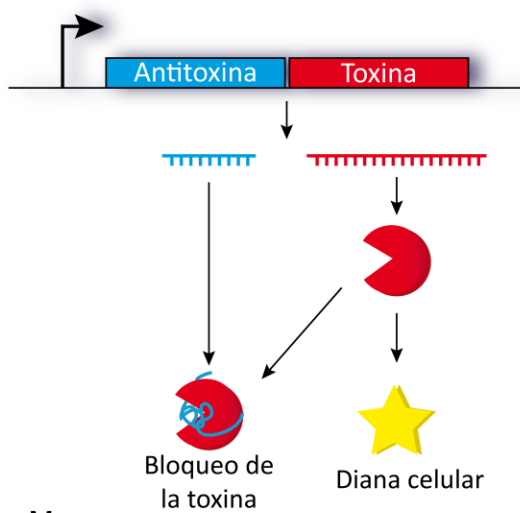
Tipo I



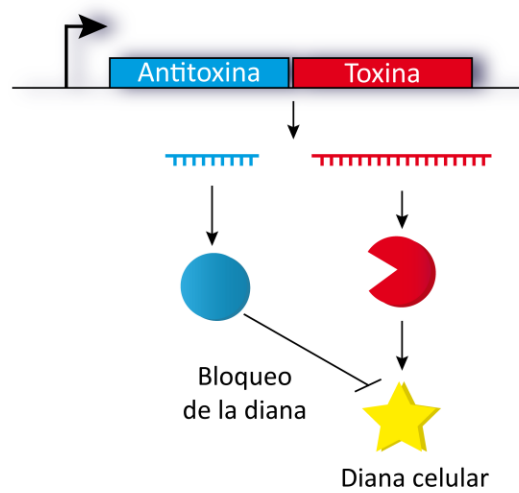
Tipo II



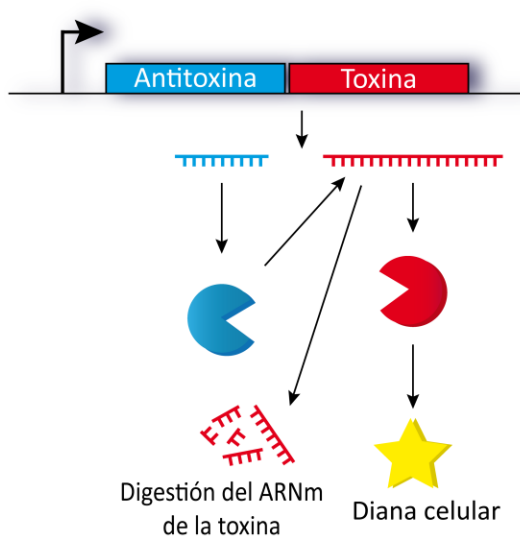
Tipo III



Tipo IV



Tipo V



Contribución de los sistemas TA a la fisiología bacteriana

Los sistemas TA fueron inicialmente detectados en plásmidos como sistemas auxiliares de mantenimiento. La aparente ausencia de función fisiológica, más allá de su carácter estabilizador del ADN y la adicción que crean en la célula, fomentó la idea de considerar a estos operones como “elementos génicos egoístas” cuya única función sería su propio mantenimiento (Tsilibaris y col., 2007, Van Melderen y Saavedra De Bast, 2009). En los últimos años, múltiples evidencias han revelado que en algunos casos los módulos TA podrían jugar un importante papel en la fisiología bacteriana, especialmente en la respuesta ante situaciones de estrés (Gerdes y col., 2005). La primera evidencia se obtuvo con el estudio de la respuesta de *E. coli* a la ausencia de aminoácidos. En esta condición, sistemas cromosómicos como *mazEF* o *relBE* son necesarios para la supervivencia de la bacteria (Christensen y col., 2001, Aizenman y col., 1996). La ausencia de nutrientes activa señales de alarma en la célula, los cuales desencadenan a su vez la activación de proteasas y ARNasas celulares en un intento de obtención de precursores. Dichas enzimas eliminan preferentemente la antitoxina (bioquímicamente más inestable que la toxina), provocando la liberación de la toxina. En este estado, la toxina ataca su diana celular, provocando una reducción en el metabolismo y crecimiento celular. Esta reducción en la tasa metabólica permite al organismo subsistir con una menor cantidad de recursos hasta que las condiciones adversas desaparecen. Al restablecerse las condiciones óptimas de crecimiento, las señales que conducen a la activación de proteasas y ARNasas disminuyen, favoreciendo por distintos mecanismos la restauración del equilibrio toxina-antitoxina. Uno de estos mecanismos, que opera en muchos sistemas tipo II es el de la cooperatividad condicional⁹. En este caso, el exceso de toxina modificaría los complejos toxina-antitoxina eficaces en regulación, eliminando la represión transcripcional del sistema y aumentando los niveles de la antitoxina. El reabastecimiento de antitoxina en la célula neutraliza la toxina (Cataudella y col., 2012). A pesar de la aparente sencillez de este proceso, los detalles de este mecanismo son aun desconocidos, y se limitan a los módulos TA tipo II.

Además del papel protector ante la ausencia de nutrientes, los sistemas TA se han relacionado también con la supervivencia bacteriana frente a estrés oxidativo (Wang y Wood, 2011, Kim y col., 2010), respuesta SOS (Kawano y col., 2007, Christensen-Dalsgaard y col., 2010) o infección por fagos

⁹ Complejos Toxina-Antitoxina (T-A) y cooperatividad condicional: Al menos en el caso de los sistemas TA tipo II, el represor transcripcional más eficiente, está formado por un complejo T-A en el que ambos componentes deben encontrarse en unas concentraciones relativas determinadas. Incrementos en los niveles de toxina, o descensos en los de antitoxina, modifican estos complejos y su capacidad represora. El aumento de toxina libre, “desarma” los complejos represores dando lugar a un complejo represor T-A débil incapaz de mantener reprimida la transcripción del sistema TA. Este hecho provoca un incremento transcripcional del operón TA (Cataudella y col., 2012).

(Fineran y col., 2009, Pecota y Wood, 1996, Hazan y Engelberg-Kulka, 2004). Algunos sistemas TA participan en otros fenómenos como la formación de biopelículas (Ren y col., 2004, Wang y Wood, 2011, Kim y col., 2009) y la aparición de células persistentes¹⁰ (Bigger, 1944, Keren y col., 2004, Maisonneuve y col., 2011, Dorr y col., 2010, Maisonneuve y col., 2013). Recientemente, diversas evidencias parecen conectar estos operones con procesos de infección. Este apartado se desarrolla con más detalle en la siguiente sección.

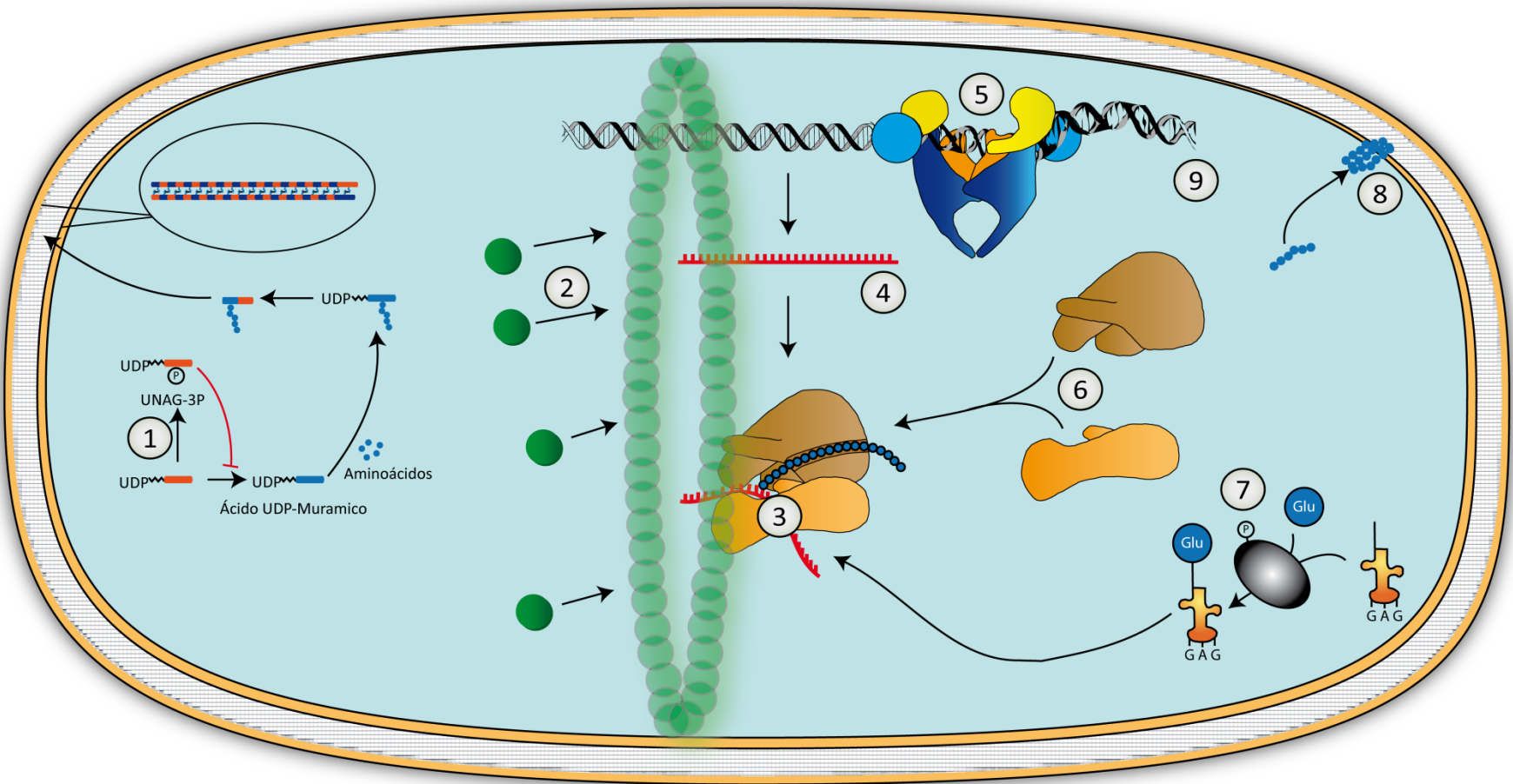
Sistemas TA y su participación en infección

Al comienzo de esta Tesis Doctoral existían muy pocos datos, la mayoría indirectos, de la posible conexión entre sistemas TA e infección. Estas observaciones se centraban en análisis genómicos comparativos (Ramage y col., 2009, Georgiades y Raoult, 2011). En ellos se describía que en general, las bacterias patógenas tienen un genoma más reducido y un mayor número de sistemas TA que especies no patógenas filogenéticamente emparentadas (Ramage y col., 2009, Georgiades y Raoult, 2011). Esta diferente distribución de módulos TA podría haber contribuido a la supervivencia de dichas bacterias patógenas en células eucariotas infectadas. Un ejemplo representativo es la mayor presencia de sistemas TA de *Mycobacterium tuberculosis* con respecto a especies no patógenas del mismo género (Ramage y col., 2009).

En 2012 se describió la primera observación directa de la participación de los sistemas TA en el establecimiento o mantenimiento de una infección. Este estudio fue realizado en la estirpe uropatógena CFT073 de *E. coli* (Norton y Mulvey, 2012). La inactivación de tres de los seis sistemas TA tipo II (*ybaJ-hha*, *yefM-yoeB* y *pasTI*) identificados en el genoma de esta cepa producía una reducción en el número de bacterias de la estirpes mutantes que se recuperaban de la vejiga (mutantes $\Delta ybaJ-hha$ y $\Delta yefM-yoeB$) o del riñón (mutante $\Delta pasTI$) en un modelo de infección de ratón. Este resultado indicaba, que los citados sistemas TA estarían contribuyendo al establecimiento y/o mantenimiento de la infección en los distintos tejidos que coloniza *E. coli* CFT073.

Un resultado similar se describió en sistemas TA de *Haemophilus influenzae*. En este caso, se emplearon dos aproximaciones complementarias: un modelo de tejido epitelial *in vitro*, denominado

¹⁰ La condición de **célula persistente** fue descrita en 1944 por Joseph Bigger (Bigger, 1944). Las células persistentes representan una pequeña parte de la población que, aun siendo genotípicamente sensibles al antibiótico, son capaces de soportar transitoriamente altas dosis de estas drogas. Este hecho diferencia la persistencia de la resistencia. Las bacterias resistentes proceden de la transmisión vertical u horizontal de un determinado gen o mutación, que inmuniza contra el efecto tóxico del antibiótico.



Leyenda

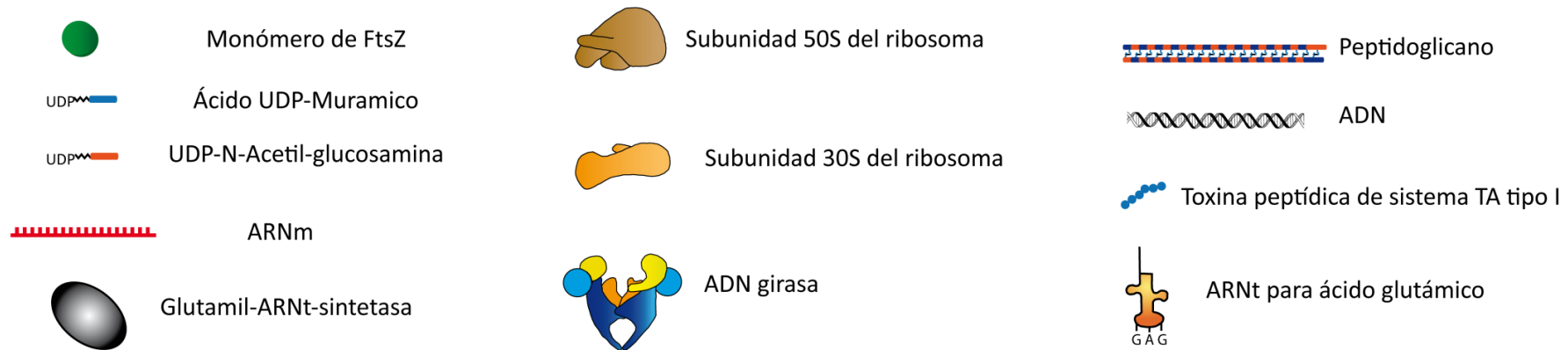


Figura 4. Dianas celulares de las toxinas de sistemas TA. 1, toxinas como ζ (sistema $\omega\epsilon\zeta$) o pezT (sistema *pezAT*) fosforilan la molécula UDP-N-acetil glucosamina (UNAG), un precursor importante en la síntesis del peptidoglicano que, a diferencia del UNAG no puede utilizarse en síntesis (Mutschler y col., 2011). 2, toxinas como CbtA (sistema *yeeU-cbtA*) o YkfI (sistema *yafW-ykfI*) bloquean la división celular mediante la inhibición de la polimerización del anillo FtsZ y MreB (Tan y col., 2011). 3, toxinas como RelE (sistema *relBE*) o HigB (sistema *higBA*) digieren las moléculas de ARNm a través de un proceso dependiente de ribosomas (Pedersen y col., 2003, Christensen-Dalsgaard y col., 2010). 4, otras toxinas como Kid (sistema *kis-kid*) o MazF (sistema *mazEF*) actúan como endorribonucleasas pero independientemente del ribosoma (Muñoz-Gómez y col., 2005, Zhang y col., 2005). 5, toxinas como CcdB (sistema *ccdAB*) o ParE (sistema *parDE*) estabilizan la interacción de la ADN girasa con el ADN, produciendo un cese de la replicación y daños en el ADN como consecuencia de la pérdida de superenrollamiento (Bernard y Couturier, 1992). 6, la toxina PasT (sistema *pasT*) bloquea la formación del ribosoma funcional, previniendo la correcta interacción de las subunidades 30S y 50S, y el proceso de traducción (Zhang y Inouye, 2011). 7, la toxina HipA fosforila e inhibe la glutamil-ARNt-sintetasa (Kaspy y col., 2013). 8, los péptidos hidrofóbicos de los sistemas TA tipo I forman poros en la membrana plasmática que desencadenan la pérdida de potencial de membrana y con ello una bajada en los niveles de ATP y metabolismo celular (Fozo y col., 2008a). 9, La toxina RalR (sistema *ralAR*) parece ser actuar como endonucleasa no específica (Guo y col. 2014).

INTRODUCCIÓN

*EpiAirWay*¹¹ (Ketterer y col., 1999) y un modelo de infección de otitis en chinchilla. Al igual que en *E. coli* CFT073, la inactivación selectiva en *H. influenzae* de tres sistemas TA (*vapBC-1*, *vapXD* y *toxAvapA*) se correlacionó con una reducción de la capacidad de la bacteria para sobrevivir en tejidos del hospedador, incluyendo el tejido epitelial del tracto respiratorio o el sistema auditivo del modelo en chinchilla (Ren y col., 2012, Ren y col., 2014).

En *S. Typhimurium*, dos trabajos recientes relacionan sistemas TA con la supervivencia y persistencia de este patógeno en el interior de células eucariotas. En uno de estos trabajos se analizaron once posibles módulos TA tipo II de la cepa patógena 12023 de *S. Typhimurium* (De la Cruz y col., 2013). Para el análisis funcional de estos sistemas TA se clonaron las toxinas de dichos módulos bajo el control de un promotor inducible, de tal manera que se pudiese medir su efecto tóxico tras su inducción. En estudios posteriores se seleccionaron aquellos sistemas TA que, en base a datos genómicos, están presentes exclusivamente en especies y serovares patógenos del género *Salmonella*. Con estos análisis se seleccionaron dos sistemas, *sehAB* (código de acceso STM4030.S-4031) y *sehCD* (STM4032.2N-4033) (del inglés "*Salmonella enterica Hig-like*", por su elevada homología con el sistema de *E. coli higBA*). Aunque la ausencia de ambos sistemas no cambió el comportamiento de *S. Typhimurium* en células epiteliales o macrófagos cultivados *in vitro*, la inactivación de uno de los dos sistemas (Δ *sehAB*) afectó la supervivencia del patógeno en ratones.

En el otro trabajo descrito para los sistemas TA de *S. Typhimurium* se detectó un incremento en la expresión del ARNm de 14 toxinas, pertenecientes a sistemas TA tipo II, en bacteria extraída del interior de macrófagos. La inactivación individual cada uno de estos 14 sistemas TA, se tradujo en una disminución del número de bacterias persistentes que se forman dentro del macrófago infectado (Helaine y col., 2014).

A pesar de las evidencias, directas o indirectas, que correlacionan sistemas TA y capacidad infectiva de las bacterias patógenas, el mecanismo por el cual estos módulos contribuyen a la supervivencia bacteriana no se ha determinado en ningún caso. Los trabajos anteriormente presentados refieren a la posibilidad de que los sistemas TA podrían inducir un estado metabólico reducido que permitiese a la bacteria sobrevivir a una condición de estrés transitoria (el ambiente intracelular). Otra hipótesis es que los sistemas TA de ciertas bacterias patógenas podrían controlar el crecimiento intracelular como mecanismo para evitar una activación excesiva del sistema inmune. Se ha descrito que ciertos módulos TA de *M. tuberculosis* (patógeno capaz de infectar su hospedador durante años) se inducen durante la infección de macrófagos (Ramage y col., 2009). Recientes evidencias experimentales sugieren además, que un sistema TA tipo *vapBC* podría contribuir a la latencia de *Mycobacterium*

¹¹ *EpiAirWay*: co-cultivo de células primarias de tejido epitelial del tracto respiratorio humano, compuesto por células ciliadas y no ciliadas, y células globosas productoras de mucina. Este modelo simula el tracto respiratorio superior humano (Ketterer y col., 1999).

smegmatis (Demidenok y col., 2014). En otro estudio llevado a cabo en la especie patógena *Neisseria gonorrhoeae*, la interrupción del sistema *fitAB*, provoca una replicación intracelular aumentada asociada a un incremento de la tasa de penetración de una monocapa de células epiteliales. La antitoxina FitA, la toxina FitB, o su complejo, podrían actuar como reguladores de la proliferación intracelular en este patógeno (Hopper y col., 2000, Mattison y col., 2006).

Como resumen, los modelos de infección y especies bacterianas empleados para analizar la posible implicación de sistemas TA en infección muestran que contribuyen a la adaptación dentro del hospedador. En el caso de patógenos bacterianos intracelulares podría considerarse una participación activa de los sistemas TA en la adaptación al ambiente del interior de células eucariotas, *a priori* hostil. Sin embargo, los trabajos aquí citados se centran única y exclusivamente en sistemas TA tipo II, obviando el resto de tipos (I, III, IV y V). Además, la mayoría de estos estudios tampoco aportan detalles de la activación de los sistemas TA durante la interacción de la bacteria y la célula hospedadora, o de los niveles de expresión de las diferentes toxinas durante la infección. Asimismo, todos estos trabajos se centran en un subconjunto del posible amplio repertorio de módulos TA presentes en las bacterias estudiadas. Esta Tesis Doctoral aborda estos aspectos, a nuestro entender de notable importancia, pero todavía no examinados.

OBJETIVOS

A pesar de la amplia literatura concerniente a los sistemas toxina-antitoxina (TA) poco se sabe acerca de las implicaciones fisiológicas de estos sistemas en la infección. Además, estos sistemas están emergiendo como posibles nuevos factores de virulencia en bacterias patógenas. Esta Tesis Doctoral se centró en el estudio de los sistemas TA de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium estirpe SL1344 y su posible implicación en la patogénesis de esta bacteria a través de los siguientes objetivos:

1. Identificación *in silico* de sistemas TA en el genoma de *S. Typhimurium* estirpe SL1344.
2. Caracterización funcional de los sistemas TA identificados
3. Contribución de los sistemas TA en la supervivencia de *S. Typhimurium* estirpe SL1344 en el interior de células eucariotas:
 - a. Análisis de la distribución de los sistemas TA entre serovares patógenos de *S. enterica* y la especie no patógena *S. bongori*.
 - b. Identificación de los sistemas TA expresados por *S. Typhimurium* estirpe SL1344 creciendo en el interior de células eucariotas.
 - c. Caracterización del efecto de mutantes de *S. Typhimurium* estirpe SL1344 carentes de sistemas TA durante la infección de células eucariotas en cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Estirpes bacterianas

Las estirpes de *S. Typhimurium* y de *E. coli*, así como los plásmidos parentales empleados en este trabajo, se muestran en la Tabla 1. Con el propósito de simplificar su contenido, únicamente se recogen en la Tabla 1 los plásmidos originales en los que se realizaron las distintas construcciones genéticas. El resto de plásmidos aparecen descritos en el ANEXO I.

Tabla 1. Estirpes bacterianas y plásmidos originales usados en este trabajo.

Especies bacterianas / Plásmidos	Estirpe	Genotipo Relevante*	Referencia
<i>E. coli</i>	MG1655	F-, λ-, <i>rph-1</i>	(Blattner y col., 1997)
<i>S. Typhimurium</i>	SL1344	<i>hisG64</i> , <i>rpsL</i>	(Hoiseith y Stocker, 1981)
	SL1344-01	<i>ta5_{ST}::Km</i>	Este trabajo
	SL1344-02	<i>phd-doc_{ST}::Km</i>	Este trabajo
	SL1344-03	<i>ta2_{ST}::Km</i>	Este trabajo
	SL1344-04	<i>parDE_{ST}::Km</i>	Este trabajo
	SL1344-05	<i>ta4_{ST}::Km</i>	Este trabajo
	SL1344-06	$\Delta ta4_{ST}$	Este trabajo
	SL1344-07	<i>relBE_{ST}::Km</i>	Este trabajo
	SL1344-08	<i>vapBC2_{ST}::Km</i>	Este trabajo
	SL1344-09	$\Delta vapBC2_{ST}$	Este trabajo
	SL1344-10	<i>vapBC2_{ST}/trbH::Km</i>	Este trabajo
	SL1344-11	<i>hok-sok_{ST}::Km</i>	Este trabajo
	SL1344-12	<i>ldrA-rdIA_{ST}::Km</i>	Este trabajo
	SL1344-13	<i>tisB-istR_{ST}::Km</i>	Este trabajo
	SL1344-14	<i>t2_{ST}-3xFLAG</i>	Este trabajo
	SL1344-15	<i>t4_{ST}-3xFLAG</i>	Este trabajo
	SL1344-16	<i>t5_{ST}-3xFLAG</i>	Este trabajo
	SL1344-17	<i>vapC2_{ST}-3xFLAG</i>	Este trabajo
	SL1344-18	$\Delta ta4_{ST}/vapBC2_{ST}::Km$	Este trabajo
	SL1344-19	$\Delta ta4_{ST}/\Delta vapBC2_{ST}/hok-sok_{ST}::Km$	Este trabajo
	SL1344-20	$\Delta ta4_{ST}/\Delta vapBC2_{ST}/\Delta hok-sok_{ST}/ldrA-rdIA_{ST}::Km$	Este trabajo
	SL1344-21	$\Delta ta4_{ST}/\Delta vapBC2_{ST}/\Delta hok-sok_{ST}/\Delta ldrA-rdIA_{ST}/tisB-istR_{ST}::Km$	Este trabajo

MATERIALES Y MÉTODOS

Especies bacterianas / Plásmidos	Estirpe	Genotipo Relevante*	Referencia
S. Typhimurium LT2	SV3081	pSLT ⁻	(Torreblanca y col., 1999)
Plásmidos	pACYC184	<i>cat, tet</i>	(Chang y Cohen, 1978)
	pFUS2	<i>aph</i>	(Lemonnier y Lane, 1998)
	pAC-P _{lac}	Plásmido derivado de pACYC184. Promotor <i>P_{lac}</i> , represor <i>lacIQ</i> , <i>cat</i> , secuencia SD optimizada	Este trabajo
	pFUS-P _{Ara}	Plásmido derivado de pBR322. Promotor <i>P_{Ara}</i> , <i>araC</i> , <i>aph</i> , secuencia SD optimizada	Este trabajo
	pKD267	Módulo de resistencia <i>aph-parE</i>	(Maisonneuve y col., 2011)
	pKD46	Recombinasa <i>λred</i>	(Datsenko y Wanner, 2000)
	pSUB11	Módulo de resistencia para etiquetado <i>aph-3xFLAG</i>	(Uzzau y col., 2001)
	pCP20	<i>bla</i> , Flipasa inducible por temperatura	(Cherepanov y Wackernagel, 1995)

* Los genes denominados como “*t*” o “*ta*” corresponden a aquellos que codifican toxinas y antitoxinas no descritas con anterioridad en ningún trabajo. La Tabla 4 muestra su correspondiente gen según la anotación del genoma de la estirpe SL1344 depositada en bases de datos: NC_016810.1, cromosoma, NC_017720.1 plásmido de virulencia pSLT, NC_017718.1, plásmido pCol1B9.

Construcción de los plásmidos pAC-P_{lac} y pFUS-P_{Ara}.

Para la clonación de los genes codificantes de toxinas y antitoxinas de *S. Typhimurium* SL1344, se diseñaron dos plásmidos recombinantes compatibles con un número de copias similar. Este diseño permitía la inducción selectiva y regulable de la expresión de los genes clonados. Se eligieron como plásmidos parentales pACYC184 (Chang y Cohen, 1978) y pFUS2 (Lemonnier y Lane, 1998). Su construcción se describe a continuación:

- **pAC-P_{lac}**: contiene el promotor *P_{lac} A1/O4/O3* del plásmido pNDM220 (Gotfredsen y Gerdes, 1998), que se obtuvo como fragmento único usando las dianas de restricción ZraI y BamHI, y se insertó en la diana BamHI del plásmido pACYC184 (interrumpiendo el gen de resistencia a

tetraciclina). Posteriormente, se insertó detrás del promotor P_{lac} entre las dianas BamHI y Sall, una fragmento de ADN que incluía una secuencia de unión a ribosomas Shine-Dalgarno (SD) optimizada (AGGAGG), asegurando así una traducción eficiente de los genes clonados (Nieto y col., 2006). Esta secuencia SD se dispuso seguida de cuatro dianas de enzimas de restricción (ZraI-SpeI-PciI-PvuI), útiles para la posterior clonación, en fase con el promotor, del gen de interés. Además, se clonó el represor $lacIQ$ entre las dianas PstI y EcoRV para asegurar la correcta represión del promotor P_{lac} .

- **pFUS- P_{Ara}** : se introdujo la misma secuencia de ADN conteniendo la secuencia SD optimizada y las dianas de enzimas de restricción usadas para la construcción de pAC- P_{lac} . En este caso se insertaron estas secuencias de ADN entre las dianas EcoRI y KpnI, justo a continuación del promotor P_{Ara} que ya poseía el plásmido pFUS2 parental.
- **pAC- P_{lac} -HIS**: plásmido derivado de pAC- P_{lac} al que se le insertó una secuencia codificante de 6 histidinas (6xHis) entre las dianas BamHI y ZraI, con el fin de confirmar la expresión de ciertas toxinas no funcionales (Anexo I).
- **pFUS- P_{Ara} -HA**: plásmido derivado de pFUS- P_{Ara} al que se le insertó una secuencia codificante de un epítipo de hemaglutinina (HA) entre las dianas EcoRI y ZraI, con el fin de poder detectar la expresión de ciertas toxinas y antitoxinas no funcionales (Anexo I).

Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) aparecen listados en el Anexo II.

Bacteriófagos.

Para las transducciones se empleó el fago P22 HT105/11 (Schmieger, 1972).

Medios de cultivo microbiológico.

Luria-Broth (LB)

Bactotripton	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	5g/l

MATERIALES Y MÉTODOS

Este fue el medio de elección para el crecimiento de todas las estirpes de *S. Typhimurium* y *E. coli*. El medio LB solidificado (LB-agar) se obtuvo añadiendo 15 g/l de agar bacteriológico. Los antibióticos kanamicina (50 µg/ml), cloranfenicol (20 µg/ml) o ampicilina (50 µg/ml) se añadieron cuando fue necesario seleccionar cepas portadoras de resistencias a antibiótico.

Placas de medio mínimo M9-ramnosa

M9 (10x)	(HNa ₂ PO ₄ 176,5 g/l, H ₂ KPO ₄ 30 g/l, NaCl 5 g/l, CINH ₄ 10 g/l)
CaCl ₂	0.01 M
MgSO ₄	0.1 M
Vit.B1 (1mg/ml)	2 g/l
Ramnosa 10%	0,5 %
H ₂ O	
Agar bacteriológico	15 g/l

Este medio de cultivo se empleó para seleccionar los recombinantes resultantes de la inactivación de sistemas TA. La ramnosa, como única fuente de carbono presente en la placa, activa el promotor que regula la expresión de la toxina *parE* presente en el módulo *aph-parE*. La expresión de *parE* selecciona negativamente las bacterias en las que no se produce la recombinación de ADN necesaria para la pérdida del módulo *aph-parE*. Este procedimiento se detalla en la sección 2.2-2 de Métodos.

Caldo de bacteriófago P22 (para 100 ml)

Lisado de P22	100 µl (conteniendo 10 ¹¹ unidades formadoras de placa/ml)
Medio NB*	98,5 ml
Glucosa 20%	1ml
Sales E 40x**	2,5 ml
MgCl ₂ 1M	1,02 ml (10mM final)

* Medio NB (*Nutrient-Broth*): Para 1 litro: 8 g NB comercial (Difco)

5 g NaCl

** Sales (E50x):	MgSO ₄ heptahidratado	2,8 g (38 mM)
	Ácido cítrico (granular)	30 g
	K ₂ HPO ₄ trihidratado	196 g
	NaNH ₄ HPO ₄	52 g
	H ₂ O	412 ml

Medio Evans Blue Uranine (EBU)

LB-Agar	100 ml
Glucosa 20% (p/v)	1,3 ml
K ₂ HPO ₄ 25% (p/v)	1 ml
Azul Evans 1% (p/v)	125 µl
Fluoresceína 1% (p/v)	250 µl

El medio EBU se empleó para determinar el estado de lisogenia en cepas obtenidas mediante transducción por bacteriófago. Un transductante está libre de bacteriófago cuando en el aislamiento en placa EBU no aparece ninguna colonia de color azul oscuro.

*Medios de cultivo de líneas celulares eucariotas.*Fibroblastos de rata NRK-49F

DMEM*	465 ml
Suero Fetal Bovino	25 ml (5%)
L-Glutamina	10 ml (4 mM)

* Medio de Eagle modificado por Dulbecco (#21969-035, GIBCO).

Suero fetal bovino: #10270-106, 500ml Fetal Bovine Serum, GIBCO

L-Glutamina: #25030-024, 100ml L-Glutamine 200mM (100X), GIBCO

Fibroblastos humanos BJ-5ta

DMEM	430 ml
Suero Fetal Bovino	50 ml (10%)
L-Glutamina	10 ml (4 mM)
Medium 199	10 ml

Medium 199: #M0650, Sigma

Células epiteliales HeLa

MEM*	435 ml
Suero Fetal Bovino	50 ml (10%)
L-Glutamina	5 ml (2mM)
Aminoácidos no esenciales	5 ml
Piruvato sódico	5 ml

MATERIALES Y MÉTODOS

* Medio Mínimo de Eagle (#21090-022, GIBCO)

Aminoácidos no esenciales: #11140-035, MEM Non-Essential Amino Acids (NEAA) (100X), GIBCO

Piruvato sódico: #11360-039, Sodium-Pyruvate 100mM, GIBCO

Todas las líneas celulares se crecieron en placas de plástico de distintos tamaños (FALCON) y se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Para su propagación, se trataron con tripsina-EDTA (*Invitrogen*) durante 5 min a 37°C para despegarlas de la placa. Posteriormente se resuspendieron con el medio de cultivo correspondiente y se cultivaron a la dilución apropiada en nuevas placas con medio de cultivo fresco.

Soluciones tampón y otras disoluciones.

Tris-EDTA (TE)

Tris-HCl pH 7,4	10 mM
EDTA	1 mM

Tampón PBS

NaCl	8g
KCl	0,2g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,89g
KH ₂ PO ₄	0,2g
H ₂ O	1l

Se ajustó el pH a 7,4.

Solución STOP extracción ARN

Fenol	5%
Etanol	95%

Solución de lisis Ipro

Triton X-100	1%
SDS	0,1%
PBS 1X pH 7,4	100 ml

Esta solución se empleó para lisar las células eucariotas infectadas con *S. Typhimurium* y extraer la bacteria intracelular en los ensayos de índice de proliferación.

Solución de lisis para cultivos a gran escala en placas de 500 cm²

Fenol pH 8	5ml (0.01%)
Etanol absoluto	95ml (19%)
SDS 10%	20ml (0.4%)
H ₂ O	380ml

Fenol pH 8: #75829, Affymetrix

Esta solución se empleó para lisar las células eucariotas en los experimentos de extracción de ARN y proteínas de bacteria intracelular. Inactiva el metabolismo de la bacteria y mantiene intactos ambos tipos de moléculas.

Solución de lavado (para 500 ml)

Etanol absoluto	95ml (19%)
SDS 10%	20ml (0,4%)
H ₂ O	385ml

Esta solución se empleó para el lavado de los sedimentos de bacterias obtenidos durante el procedimiento de extracción de ARN y proteínas de bacteria intracelular.

Tampón Tris-glicina-SDS

Tris pH 8,5	0,025 M
Glicina	0,192 M
SDS	0,1% (m/v)

Tampón Tris-tricina-SDS

<u>Ánodo</u>		<u>Cátodo</u>	
Tris-HCl pH 8,9	0,2 M	Tris-HCl pH 8,25	0,1 M
		Tricina	0,1 M
		SDS	0,1 %

Tampón TBST

NaCl	137mM
Tween-20	0,1% (m/v)
Tris-HCl pH 7,5	20mM

MATERIALES Y MÉTODOS

Tampón A (proteómica)

Ácido fórmico	0,1 %
Acetonitrilo	2,1%

Tampón B (proteómica)

Ácido fórmico	0,1 %
Acetonitrilo	99,9%

Métodos

Conservación de células eucariotas.

Para el almacenamiento de células eucariotas se partió de cultivos con una confluencia del 80-90% ($5,6 \times 10^5$ - $6,3 \times 10^5$ células por placa de cultivo). Las células se despegaron de las placas de cultivo con tripsina-EDTA, se resuspendieron en 10 ml de medio de cultivo previamente calentado a 37°C, y se centrifugaron 2 min a temperatura ambiente y 2200 rpm. Tras retirar el sobrenadante, se solubilizó el sedimento de células con 1 ml de suero fetal bovino suplementado con 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) a temperatura ambiente. Las células se dispusieron en tubos especiales para su congelado y se introdujeron a -20° 4h. Posteriormente se introdujeron los viales a -80° toda la noche. Al día siguiente se pasaron los viales a un tanque de nitrógeno líquido a -170°C.

Genética bacteriana.

Clonación de genes codificantes de toxinas y antitoxinas.

Las secuencias de las regiones codificantes de las diversas toxinas y antitoxinas, identificadas con las bases de datos consultadas, se amplificaron por PCR a partir de ADN genómico extraído de una estirpe silvestre de *S. Typhimurium* SL1344. Se emplearon oligonucleótidos que contenían dianas para las enzimas de restricción ZraI y SpeI. Los fragmentos amplificados por PCR se ligaron con los vectores de expresión pAC-P_{lac} o pFUS-P_{Ara} durante 30 min a 24°C, y se transformaron células competentes de *S. Typhimurium* SL1344 silvestre preparadas por el método de el CaCl₂. Todas las construcciones se confirmaron por secuenciación.

Para aquellas toxinas y antitoxinas en las que se quiso confirmar su expresión mediante inmunodetección con anticuerpos, los correspondientes genes se clonaron en los plásmidos pAC-P_{lac}-

HIS o pFUS-P_{Ara}-HA que contenían, respectivamente, una secuencia que codifica un epítipo 6xHis o HA, en fusión traduccional con el gen clonado.

Inactivación de genes cromosómicos y plasmídicos.

Se adaptó el método descrito inicialmente por Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner, 2000) y modificado posteriormente por Maisonneuve y colaboradores (Maisonneuve y col., 2011). Este procedimiento permite la delección “limpia”¹² del gen diana y se basa en el uso de un módulo que contiene un gen de resistencia a kanamicina *aph* (como primer marcador de selección) y el gen codificante de la toxina *parE* (como segundo marcador de selección). La transcripción de *parE* está controlada por un promotor inducible por ramnosa. Este módulo se amplifica con oligonucleótidos que poseen homología con las regiones adyacentes a la secuencia de ADN que se quiere deleccionar. Mediante un primer paso de recombinación homóloga (mediado por la recombinasa Red del fago λ) se sustituye el gen diana por el módulo descrito (Figura 5A), seleccionando los recombinantes en placas de LB-agar suplementadas con kanamicina y glucosa. Gracias a un segundo paso de recombinación (también mediado por la recombinasa λ -Red) se elimina el módulo de resistencia a antibiótico. Para este segundo paso se seleccionan las colonias en placas de medio mínimo M9 que contienen ramnosa como única fuente de carbono. A continuación se describe detalladamente el método.

Partiendo de un cultivo de *S. Typhimurium* SL1344 transformado con el plásmido pKD46 (Tabla 1) crecido 16 h a 30°C a 100 rpm en LB (suplementado con ampicilina 50 μ g/ml), se inoculó un cultivo fresco de 1,4 ml en un tubo *ependorf* de 2ml con la tapa perforada para facilitar la aireación. Se creció 2 h a 30°C y 1100 rpm (*Thermo mixer compact*), antes de inducir la expresión de la recombinasa del fago λ 1 h con 0,3 % arabinosa. Posteriormente se centrifugó el cultivo (1 min 11000 rpm a 4°C), se lavaron las células con agua destilada primero, y glicerol al 10% estéril después, y se electroporaron (en una cubeta de *BioRad* a 2,5kV 5 ms) con el fragmento *aph-parE* que contenía 50 pb en los extremos 5'- y 3'- homólogos (los oligonucleótidos vienen descritos en el Anexo II) a las regiones 5'- y 3'- adyacentes a los genes diana que se pretendía deleccionar (Figura 5A). Tras la electroporación se recuperaron las células con 1 ml de medio LB, se crecieron 3 h a 37°C 1100 rpm y se sembraron en placas de LB-agar suplementadas con kanamicina 50 μ g/ml y glucosa al 0,2 %. Sobre esta estirpe, para limpiar la resistencia a antibiótico, se transformó de nuevo con el plásmido pKD46 y se repitió el procedimiento anteriormente descrito. En este caso se amplificaron por PCR 500 pb

¹² El método diseñado por Datsenko y Wanner se basa en la inserción de un módulo con una resistencia a antibiótico y su posterior eliminación gracias a secuencias repetidas flanqueantes que son reconocidas por una flipasa. Durante este proceso se introduce una de estas secuencias en el genoma. La acumulación de estas secuencias en el genoma puede generar recombinaciones no deseadas en nuevos pasos de delección.

MATERIALES Y MÉTODOS

homólogas a la región previa a la zona donde estaba insertado el módulo *aph-parE*, y otras 500 pb homólogas a la región posterior (Figura 5B). Usando como molde estos dos fragmentos de PCR (los cuales poseían regiones homólogas entre sí) se amplificó por PCR un único fragmento de ADN de unas 1000 pb (Figura 5B). Este fragmento de ADN es el que se usó para electroporar el cultivo. En este segundo paso de recombinación se eliminaba el módulo *aph-parE* (Figura 5C y D). Para seleccionar las nuevas células recombinantes, se sembró el cultivo en placas de medio mínimo M9 suplementado con ramnosa al 0,5 %.

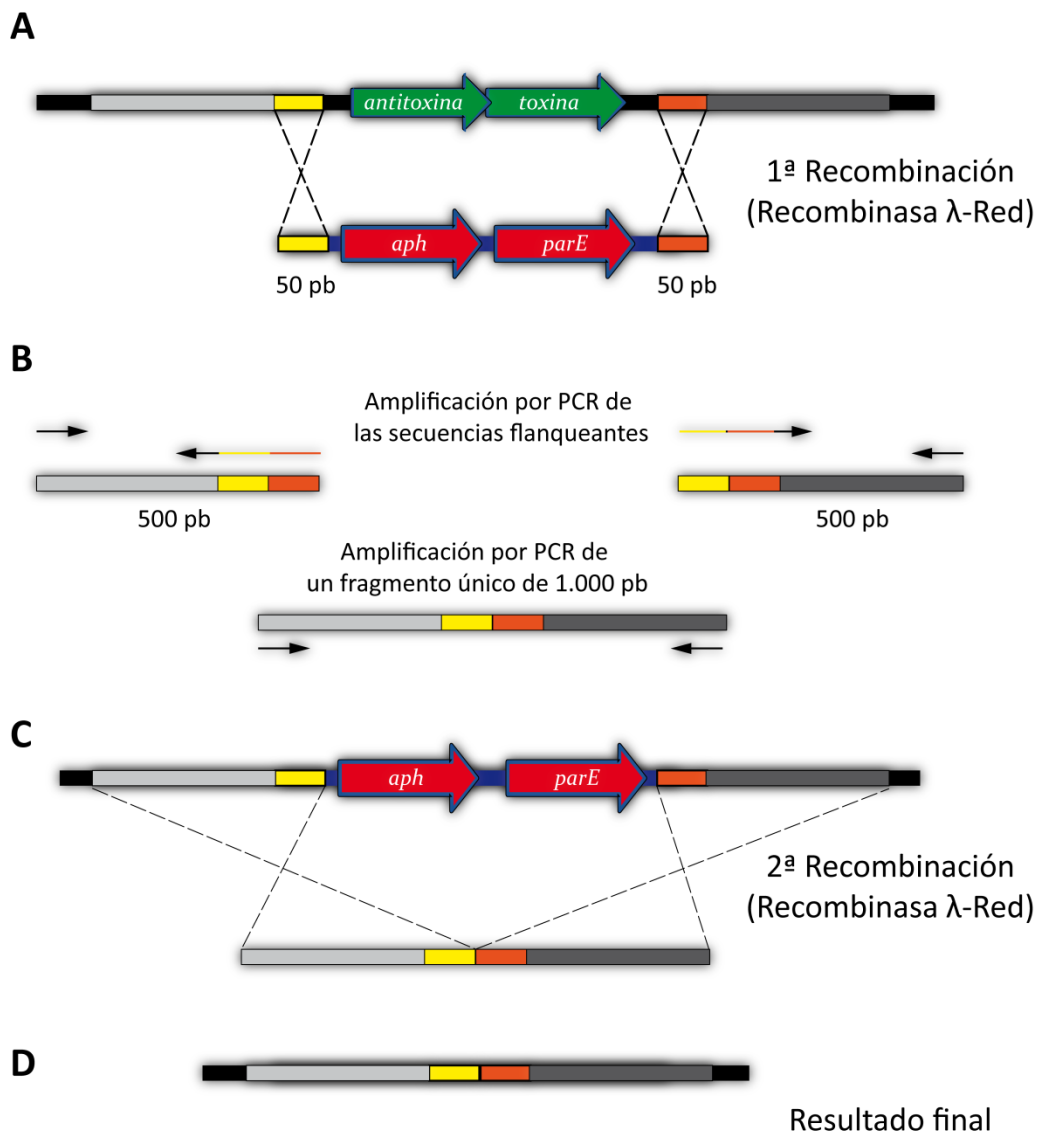


Figura 5. Esquema del procedimiento seguido para la delección de los sistemas TA. Primero se amplifica un módulo que contiene un gen de resistencia a kanamicina *aph* y el gen codificante de la toxina *parE* flanqueado por dos secuencias homólogas al punto de inserción deseado, y que permiten la primera recombinación (A). Después se amplifican por PCR las secuencias adyacentes al lugar de inserción del módulo *aph-parE* (B). Finalmente, en un segundo paso de recombinación (C) el módulo *aph-parE* se sustituye por el fragmento de PCR previamente amplificado, dejando el ADN libre de cualquier secuencia exógena (D).

Etiquetado de proteínas en *S. Typhimurium*.

Se siguió el método previamente descrito (Uzzau y col., 2001), empleando los oligonucleótidos listados en el Anexo II y los plásmidos pKD46 (Datsenko y Wanner, 2000) y pSUB11 (Uzzau y col., 2001) descritos en la Tabla 1. Con este procedimiento se insertó un epítipo 3xFLAG en el extremo C-terminal de las toxinas T2_{ST}, T4_{ST}, T5_{ST} y VapC2_{ST}.

Transformación de *S. Typhimurium*: método del CaCl₂ y electroporación.

Para la preparación de células competentes por el método del CaCl₂ se siguieron métodos previamente descritos (Hanahan, 1983, Lederberg y Cohen, 1974). Tras el tratamiento de las células con 0,1 M de CaCl₂ durante 1 h, se transformaron a través del método del choque térmico (Sambrook y Pollack, 1974). Cuando las células competentes iban a ser almacenadas a -80°C, se añadió glicerol estéril a una concentración final del 10%.

Para la electroporación se lavaron los cultivos dos veces: primero con agua destilada estéril, y después con glicerol al 10% estéril (ambos previamente enfriados a 4°C). La electroporación se llevó a cabo de manera similar a como se ha descrito previamente (Dower y col., 1988). Se utilizó el electroporador *MicroPulse* de Bio-Rad a 2,5 kV 5 ms.

Obtención de lisados de bacteriófagos P22.

Para la obtención de mutantes múltiples en los sistemas TA de *S. Typhimurium* SL1344 se partió de cepas en las que se habían inactivado individualmente cada uno de estos operones por inserción del módulo *aph-parE* previamente descrito. Posteriormente se transdujeron mediante fago P22 estos módulos de resistencia, desde las estirpes donadoras a la cepa receptora. Estos procedimientos se recogen en este apartado y en el siguiente.

Se crecieron las estirpes de la que se querían obtener los lisados durante toda la noche a 37°C 125 rpm en 5 ml de medio LB. Al día siguiente se mezcló 1 ml de cultivo con 4 ml de caldo de bacteriófago P22 obtenido de una estirpe de *S. Typhimurium* SL1344 silvestre, y se incubó 16h a 37°C a 100 rpm. Tras esta incubación se centrifugó el cultivo 20 min a 4500 rpm, se añadieron 100 µl de cloroformo al sobrenadante y se agitó vigorosamente la mezcla. Se dejó reposar al menos 1 día a 4°C antes de su posterior uso, para asegurar una correcta separación de las fases, y permitir la sedimentación del cloroformo.

Transducción en medio líquido.

Partiendo de los lisados obtenidos según el apartado anterior, se crecieron cultivos durante toda la noche a 37°C 125 rpm en 5 ml de medio LB. Al día siguiente se mezclaron 200 µl de cultivo con 200 µl del lisado procedente de la cepa donadora (cuyo marcador antibiótico se quería transducir), y se incubó 15 min a 37°C sin agitación. Posteriormente se incubó la mezcla otros 20 min a 37°C pero esta vez a 100 rpm, se centrifugó y se sembró en placas de LB-agar suplementadas con kanamicina 50 µg/ml y glucosa al 0,2 %.

Para el chequeo de transductantes libre de fago se empleó el medio EBU tal y como se describió anteriormente (Chan y col., 1972).

Extracción y manipulación de ácidos nucleicos.

Aislamiento de ADN plasmídico.

La extracción del ADN plasmídico tanto de *S. Typhimurium* como de *E. coli* se llevó a cabo utilizando el kit comercial *High Pure Plasmid Isolation* (Roche, España).

Aislamiento de ADN genómico.

Para la amplificación de los genes codificantes de toxinas y antitoxinas se usó como ADN molde, ADN genómico total de *S. Typhimurium* SL1344 silvestre purificado por el método del bromuro de cetil-trimetil amonio –CTAB- (Murray y Thompson, 1980).

A partir de un cultivo crecido toda la noche a 37°C y 125 rpm, se centrifugaron 1,5 ml de cultivo. Se descartó el sobrenadante resuspendiendo el sedimento de bacterias en 560 µl de TE, al que se le añadieron después 30 µl de SDS al 10% y 3 µl de proteinasa K 10 mg/ml. La mezcla se incubó 1 h a 37°C. Tras este tiempo, se añadieron 100 µl de NaCl 5 M y 80 µl de CTAB [10 (p/v) / 0,7 M NaCl] y se incubó la mezcla 10 min a 65°C. Después se añadieron 700 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (a una relación 24:1), se centrifugó 5 min a temperatura ambiente y 13.000 rpm y se tomó la fase acuosa. Se repitió el lavado con cloroformo/alcohol isoamílico y se añadieron 360 µl de etanol absoluto frío, dejando la mezcla a -20°C al menos 20 min. Se centrifugó 5 min a 4°C y 13.000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se lavó con 500 µl de etanol 70% (en agua). Una vez secado al aire el precipitado de ADN, se resuspendió en 100 µl de TE.

Extracción de ARN.

El ARN se purificó mediante el método del Trizol. El procedimiento seguido fue el mismo tanto para la bacteria crecida en el interior de células humanas infectadas¹³, como para la bacteria crecida 16 h en medio LB. Al cultivo se le añadieron 200 µl de solución *STOP*, y se incubó 30 min a 4°C. Tras esta incubación se centrifugó la muestra a 13.000 rpm, se resuspendió el sedimento en 100-150 µl de TE suplementado con 0,2-10 µg/ml de lisozima y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se añadió 1 ml de *Trizol reagent (Invitrogen)* y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se añadieron después 200 µl de cloroformo y se incubó 3 min a temperatura ambiente. Tras una centrifugación 10 min a 4°C y 14.000 rpm, se recogió la fase acuosa, se movió a otro tubo que contenía 200 µl de cloroformo y se incubó otros 5 min temperatura ambiente. Se repitió este lavado con cloroformo y finalmente se llevó a cabo una precipitación con etanol de la misma manera que la llevada a cabo para extraer el ADN genómico. Adicionalmente, para incrementar la eficacia del proceso de precipitado, se añadieron 20 µg de glicógeno (Roche). Se resuspendió la muestra en 50 µl de agua libre de ARNasas y se trató con ADNasa 1 h a 37°C (*Turbo DNA-free kit Ambion/Applied Biosystems*). Finalmente se resuspendió la muestra en 30 µl de agua libre de ARNasa.

Reacción en cadena de la polimerasa.

Las reacciones de PCR a partir de ADN genómico o plasmídico se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl, conteniendo 0,2 mM dNTPs, 2,5 µl tampón Pfu (*Agilent Technologies*), 0,5 µl de ADN polimerasa Pfu (*Agilent Technologies*), 0,5 µM de cada oligonucleótido (Anexo II) y 50-100 ng ADN molde. Se utilizó un termociclador *Mastercycler gradient* de Eppendorf. Las condiciones generales de tiempo y temperatura empleadas para las reacciones de PCR fueron:

Desnaturalización	95°C 10 min	1 ciclo
Desnaturalización	95°C 1 min	} 25-30 ciclos
Anillamiento	53-66°C 1 min	
Elongación	72°C 1-3 min	
Elongación	72°C 10 min	1 ciclo

PCR cuantitativa en tiempo real.

Esta técnica se empleó para valorar la expresión diferencial de los ARNm de las toxinas de sistemas TA tipo I en bacteria extracelular e intracelular.

¹³ En este caso se aisló el ARN total, eucariota y procariota.

A partir de 1 o 2 µg de ARN extraído de los distintos tipos de muestras (*S. Typhimurium* SL1344 extraída de células eucariotas infectadas durante 24 h, o crecida 16 h a 37°C sin agitación en medio LB), se sintetizaron librerías de ADNc (*High-capacity cDNA archive kit*, Applied Biosystems). Para la reacción de qPCR, se empleó *Power Sybr Green PCR master mix* (Applied Biosystems) en un volumen final de 10 µl empleando los oligonucleótidos descritos en el Anexo II. Las reacciones se llevaron a cabo con el equipo ABI Prism 7.500 siguiendo las recomendaciones del fabricante. Cada muestra de ADNc se procesó como tres réplicas técnicas y al menos en tres experimentos independientes.

Secuenciación de ADN.

La secuenciación de los diversos plásmidos recombinantes se llevó a cabo por el servicio de secuenciación de ADN Secugen (<http://www.secugen.es>).

Infección de células eucariotas con S. Typhimurium.

Determinación de la tasa de invasión e índice de proliferación.

Se siguió un método previamente descrito (Aiastrui y col., 2010, Nuñez-Hernández y col., 2013). El método se basó en la infección de células eucariotas (fibroblastos o células epiteliales HeLa) en placas de 24 pocillos con las distintas estirpes de *S. Typhimurium* crecidas a en medio LB a 37°C durante 16 h sin agitación. Se infectaron las células eucariotas con una multiplicidad de infección 10:1 (bacteria: célula eucariota) durante 20 min. Tras este tiempo se añadió medio de cultivo nuevo previamente calentado a 37°C conteniendo gentamicina¹⁴ 100 µg/ml de durante aproximadamente 90 min (hasta las 2 h post-infección), y gentamicina 10 µg/ml durante el tiempo restante de la infección (22 h) cuando se llevaron a cabo infecciones a tiempos más largos (Finlay y Falkow, 1988). Los fibroblastos infectados se lisaron a las 2 o 24 h post-infección para la determinación de número de viables intracelulares. Para la lisis se añadieron 100 µl de solución de lisis lpro previamente calentada a 37°C, y se incubó 5 min a 37°C. Tras este tiempo se añadieron 400 µl de PBS pH 7,4 y se hicieron diluciones seriadas en tampón PBS. El número de bacterias viables, tanto del inóculo empleado para infectar las células eucariotas como de la bacteria intracelular, se obtuvo sembrando distintas diluciones seriadas en placas de LB-agar. Se sembraron tres placas por cepa, dilución y tiempo. Tras el contaje del número de colonias se calcularon la tasa de invasión e índice de proliferación como sigue:

¹⁴ La gentamicina elimina la bacteria extracelular no interfiriendo con la bacteria intracelular (Finlay y Falkow, 1988).

- **Tasa de invasión** = $\frac{\text{N}^\circ \text{ bacterias viables tras 2 h postinfección}}{\text{N}^\circ \text{ bacterias viables en el inóculo}}$. Este cociente muestra la capacidad infectiva de una estirpe.
- **Índice de proliferación** = $\frac{\text{N}^\circ \text{ bacterias viables tras 24 h postinfección}}{\text{N}^\circ \text{ bacterias viables tras 2 h postinfección}}$. Este cociente muestra la capacidad proliferativa o de supervivencia promedio de una estirpe. Un incremento en este valor indicaría una proliferación aumentada, mientras que un descenso es signo de una menor supervivencia intracelular.

Para estos ensayos se hicieron tres réplicas técnicas por experimento, cepa y tiempo, así como, al menos, tres réplicas biológicas por cepa y tiempo de infección.

Extracción de bacteria intracelular para la purificación de ARN o proteína.

Para la obtención de bacteria intracelular a partir de fibroblastos o células epiteliales infectados se siguió el protocolo descrito por Erikson y colaboradores (Eriksson y col., 2003), con algunas modificaciones (Nuñez-Hernández y col., 2013). Dado que *S. Typhimurium* presenta una tasa de proliferación baja en fibroblastos en cultivo, se infectaron de 4 a 12 placas BioDish-XL 500-cm² (BD Biosciences) por cepa.

Este método es muy similar al descrito en el apartado anterior, con la salvedad de que en este caso las células eucariotas se lisaron con una solución que permitiese conservar la integridad del ARN y las proteínas bacterianas (Fenol pH 8 0,01%, etanol 19% y SDS 0,1%). Tras el lisado se mantuvieron las muestras a 4°C, antes de transferirlas a tubos de centrifuga de polipropileno (Sorvall) y centrifugarlas a 25.000 g durante 30 min. Tras realizar un lavado con 1 ml de solución de lavado, el sedimento de bacteria se almacenó a -80°C cuando fue necesario. Esta muestra de bacterias se utilizó para extraer ARN o la inmunodetección de proteínas por anticuerpos.

Preparación y manipulación de muestras de proteínas.

Preparación de extractos totales de proteínas e inmunodetección con anticuerpos.

Las muestras de bacteria extracelular (inóculo utilizado en la infección) e intracelular se resuspendieron en tampón Laemmli 1 o 2x (Laemmli, 1970), se hirvieron en un bloque a 100°C durante 30 min, y se cargaron en geles desnaturalizantes de 0,75 mm de grosor de poli(acrilamida)-SDS al 12,5% y tampón tris-glicina o tris-tricina.

Las muestras de bacteria intracelular, por presentar un número muy bajo de bacterias se resuspendieron en 30 µl de tampón Laemmli 2x. Las muestras de bacteria estacionaria se resuspendieron en 100 µl de tampón Laemmli 1x. En ambos casos se ajustó el volumen de carga

MATERIALES Y MÉTODOS

usando como control de carga la proteína IgaA (Domínguez-Bernal y col., 2004). Las muestras procedentes de la inducción de toxinas o antitoxinas en bacteria extracelular, se resuspendieron en tampón Laemmli 1x a una concentración final fija de 0,02 unidades de absorbancia/ μ l, de las que se procesaron 10 μ l.

Tras la resolución de proteínas por electroforesis, se transfirieron a membranas de polivinildeno difluorado (PDVF, Bio-Rad) a un voltaje constante de 12V durante 90 min (*Trans-Blot Semi-Dry Transfer*, Bio-Rad, USA). Se bloqueó la membrana durante toda la noche a 4°C con tampón TBST suplementado con leche desnatada al 5 %. Al día siguiente se lavó la membrana 10 min en TBST, y se incubó con el anticuerpo correspondiente¹⁵ diluido en TBST suplementado con leche desnatada al 3% durante 2 h 30 min. Pasado este tiempo, se lavó tres veces la membrana, con agitación, en tampón TBST durante 15 min. Se incubó 1h con anticuerpo secundario unido a peroxidasa de rábano diluido en TBST suplementado con leche desnatada al 3 %. Finalmente se lavó la membrana tres veces en TBST durante 15 min y se reveló usando el *kit* de detección *ECL Plus* (GE Healthcare) y autorradiografías (AGFA Healthcare NV, Morstel, Belgium).

Inducción y detección de la expresión de toxinas y antitoxinas.

En el caso de las proteínas que no mostraron una funcionalidad adecuada en los ensayos de toxicidad y neutralización, se volvieron a clonar sus respectivos genes codificantes en los mismos vectores, pero esta vez fusionados traducionalmente a un epítipo HA o 6xHis.

Para la detección de estas proteínas se diluyeron cultivos (dilución 1:100) crecidos en medio LB durante 16 h a 37°C y 125 rpm, en matraces de 125 ml conteniendo 15 ml de medio LB fresco, y se incubaron a 37°C y 125 rpm hasta obtener una densidad óptica (medida a 600 nm) de 0,3. Se indujo entonces la expresión de la proteína correspondiente, mediante la adición de 0,4 % de arabinosa o 2 mM IPTG, según el vector empleado, durante 3 h. Se centrifugaron 2 ml de cultivo resuspendiendo los sedimentos de bacterias en tampón Laemmli 1x a una concentración final fija de 0,02 unidades de absorbancia/ μ l.

Microscopía óptica: obtención y fijación de muestras.

Para la visualización de los cultivos de bacterias transformados con los plásmidos recombinantes que portaban las toxinas no funcionales, se utilizó el microscopio Nikon Eclipse 90i, equipado con un

¹⁵ Anticuerpos monoclonales primarios producidos en ratón: anti-FLAG (Sigma, USA), anti-HA conjugado a peroxidasa de rábano (Sigma, USA), anti-HIS (Sigma, USA).

Anticuerpo policlonal primario producido en conejo: anti-IgaA

Anticuerpos policlonales secundarios: cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (BIO-RAD), cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano (BIO-RAD)

objetivo de aceite de inmersión CFI Plan VC x 100 y una cámara CCD ORCA-R². Se ajustó el tiempo de exposición en las imágenes de contraste diferencial de interferencia entre 100 – 300 ms. Las muestras de bacterias utilizadas en estos experimentos se obtuvieron según lo descrito en el apartado anterior, y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 min. Posteriormente se lavaron dos veces con tampón PBS pH 7,4 y se resuspendieron en 100 µl de PBS para obtener DO600_{nm} de 0,7. Cuando fue necesario, se diluyeron las muestras en PBS para obtener una concentración de bacterias adecuada para su visualización.

Espectrometría de masas: análisis proteómico.

Los extractos de proteína para su posterior análisis proteómico se prepararon a partir de un total de tres muestras independientes de *S. Typhimurium* SL1344 silvestre extraída del interior de fibroblastos humanos BJ-5ta, y dos muestras independientes de bacteria extracelular crecida durante 16 h en medio LB a 37°C sin agitación. Esta última condición corresponde a la bacteria usada para las infecciones de las cuales se obtendría después la bacteria intracelular. Las muestras se procesaron en geles desnaturalizantes de 1 mm de grosor de poliacrilamida-SDS al 15% y se tiñeron con el *kit* comercial *Colloidal blue staining (Invitrogen)*. Estos geles se dividieron en 8 fragmentos, se lavaron con una solución de 50 mM de bicarbonato amónico al 50% de acetonitrilo (ACN) y se deshidrataron con una solución de ACN al 100%. Los fragmentos de gel se rehidrataron en una solución de 50 mM de bicarbonato amónico suplementada con tripsina 12,5 ng/µl, y se incubaron toda la noche a 30°C. Los péptidos resultantes de la digestión fueron extraídos a 37°C con 100% ACN, secados con una solución 0,5% de ácido trifluoroacético, lavados con *ZipTip* (Millipore) y reconstituídos en 5 µl de tampón A. Esta mezcla de péptidos se cargó en una columna C18-A1 ASY-Column (Thermo Scientific EASY-Column), se eluyó con una columna *Biosphere C18* (NanoSeparations), y se separó durante 150 min en tampón B. La velocidad de flujo fue de 250 nl/min usando el cromatógrafo EASY-nLC (Thermo Scientific) acoplado a una fuente de *nanoelectrospray* EASY-Spray (Thermo Scientific). Los espectros de masas se adquirieron usando la tecnología LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific, San Jose, CA). Los espectros MS (masa/carga 300-2.000) se adquirieron con el Orbitrap empleando un valor de 1.000.000 a una resolución de 30.000 masa/carga 400. La identificación de péptidos se llevó a cabo a través de los espectros CID (las siglas del inglés “*Collision Induced Dissociation*”) y HCD (las siglas del inglés “*Higher-Energy Collision Induced Dissociation*”). Para la fragmentación CID se fijó un valor de 10.000 y se normalizó la energía de colisión al 35%. Para la fragmentación HCD se fijó un valor de 50.000 y se normalizó la energía de colisión al 45%.

Ensayos de toxicidad y neutralización.

Para validar la actividad funcional de las toxinas y antitoxinas de clonadas, se transformó *S. Typhimurium* SL1344 silvestre con los plásmidos correspondientes. Dependiendo del experimento, se transformaron adicionalmente con algunos plásmidos las estirpes *E. coli* K-12 MG1655 o *S. Typhimurium* LT2 SV3081 (pSLT').

A partir de 5 ml de cultivos crecidos en medio LB durante 16 h a 37°C y 125 rpm (suplementado con los antibióticos correspondientes), se inocularon matraces conteniendo 15 ml de medio LB (suplementado con los antibióticos correspondientes) con 125 µl de cultivo y se incubaron a 37°C 125 rpm hasta obtener una DO₆₀₀ de 0,3. En este punto, se tomaron alícuotas de 1 ml, que se lavaron una vez con tampón PBS pH 7,4, y se hicieron cinco diluciones seriadas (1/10) en tampón PBS. Se sembraron 7 µl de cada dilución en placas de LB-agar que contenían: i) kanamicina 50 µg/ml o cloranfenicol 20 µg/ml, según el vector que portase la cepa; ii) IPTG, arabinosa o ningún inductor, según si se pretendía inducir la expresión de una proteína, de las dos o de ninguna. Las concentraciones de inductores se ajustaron para cada sistema toxina-antitoxina (Tabla 2), con el fin de obtener un fenotipo de toxicidad y neutralización claros.

Tabla 2. Concentración de inductores empleados en los ensayos de toxicidad y neutralización.

Nombre del sistema TA	Concentración de IPTG (mM)	Concentración de Arabinosa (%)
<i>ccdAB</i> _{ST}	1	0,3
<i>ccdAB</i> _{ST} R99W	1	0,05
<i>dinJ-yafQ</i> _{ST}	0,4	0,2
<i>higBA</i> _{ST}	0,4	0,2
<i>parDE</i> _{ST}	0,3	0,3
<i>pasTI</i> _{ST}	1	0,3
<i>pasTI</i> _{ST} Mut	1	0,3
<i>phd-doc</i> _{ST}	0,4	0,2
<i>relBE</i> _{ST}	1	0,3
<i>relBE2</i> _{ST}	0,4	0,2
<i>relBE3</i> _{ST}	0,4	0,3
<i>relBE4</i> _{ST}	1	0,3
<i>sehAB</i> _{ST}	1	0,05
<i>sehCD</i> _{ST}	0,3	0,2
<i>shpAB</i> _{ST}	0,3	0,3

Nombre del sistema TA	Concentración de IPTG (mM)	Concentración de Arabinosa (%)
<i>ta1</i> _{ST}	0,4	0,3
<i>ta2</i> _{ST}	0,3	0,3
<i>ta3</i> _{ST}	1	0,3
<i>ta4</i> _{ST}	1	0,3
<i>ta5</i> _{ST}	0,1	0,3
<i>vapBC</i> _{ST}	1	0,05-0,3
<i>vapBC2</i> _{ST}	1	0,05
<i>hok</i> _{ST}	-	0,3
<i>ibsA</i> _{ST}	1	-
<i>ibsB</i> _{ST}	1	-
<i>ldrA</i> _{ST}	1	-
<i>ldrB</i> _{ST}	1	-
<i>symER</i> _{ST}	-	0,4
<i>tisB</i> _{ST}	-	0,3

Herramientas y procedimientos informáticos.

Búsqueda e identificación de genes codificantes de toxinas y antitoxinas en el genoma de *S. Typhimurium* SL1344.

Para la identificación de genes codificantes de sistemas TA en el genoma de *S. Typhimurium* SL1344 se descargaron las secuencias de nucleótidos completa de su cromosoma (NC_016810.1) y los tres plásmidos que porta esta cepa: pSLT (NC_017720.1), pCol1B9 (NC_017718.1) y pRSF1010 (NC_017719.1). Para los distintos tipos de sistemas TA se consultaron distintas bases de datos:

- Sistemas TA tipo I: (Fozo y col., 2010)
- Sistemas TA tipo II: TADB (<http://bioinfo-mml.sjtu.edu.cn/TADB/>) (Shao y col., 2011), (Sberro y col., 2013), (Leplae y col., 2011) y RASTA (<http://genoweb1.irisa.fr/duals/RASTA-Bacteria/>)
- Sistemas TA tipo III: (Blower y col., 2012)

Para las bases de datos para los sistemas TA tipo I y III, así como el estudio de Sberro y colaboradores (Sberro y col., 2013), únicamente se extrajo la información recogida en el material suplementario de dichos trabajos. Para los sistemas TA tipo II se disponía además de dos aplicaciones informáticas (TADB y RASTA) que permitían la búsqueda *de novo*, de nuevos posibles módulos. En el

caso de RASTA, la aplicación permite la búsqueda de sistemas TA, sin importar el tamaño de la secuencia de nucleótidos que se introduzca. Sin embargo, TADB limita el tamaño máximo de nucleótidos que se pueden analizar por vez. Por ello, se fragmentó el cromosoma de *S. Typhimurium* en cuatro secciones, y tres regiones adicionales solapantes con las otras cuatro regiones dos a dos. Esta estrategia permitiría detectar aquellos posibles sistemas que pudiesen estar codificados entre dos secciones. Los plásmidos no fue necesario fragmentarlos. Se utilizó el motor de búsqueda WU-BLAST 2.0 que enfrenta las secuencias de interés frente a todos los sistemas TA identificados en la base de datos TADB v1.1. Como matriz de comparación se empleó BLOSUM62¹⁶ (Henikoff y Henikoff, 1992, Eddy, 2004), con unos parámetros de corte y longitud de secuencia estándar, así como un valor-e de 0,01. Posteriormente se curaron manualmente los resultados, descartando aquellos posibles sistemas cuyos genes fuesen mayores de 650 pb, no estuviesen formando parte de un operón (estableciendo una distancia máxima entre genes del mismo operón de 150 pb), o estuviesen caracterizados funcionalmente como genes no relacionados con sistemas TA. Con estos parámetros, se aseguró una detección fiable de los posibles sistemas TA, descartando el mayor número posible de falsos positivos. Una vez llevada a cabo la búsqueda con aplicaciones TADB y RASTA, se compararon los resultados obtenidos entre sí, así como con la base de datos desarrollada por Leplae y colaboradores (Leplae y col., 2011).

Con el fin de identificar el mayor número de sistemas TA en el genoma de *S. Typhimurium* SL1344, se llevaron a cabo otras aproximaciones complementarias a las búsquedas anteriormente descritas. Este procedimiento consideraba los siguientes aspectos: i) las bases de datos disponibles no englobaban sistemas TA tipo III, IV y V (este último se describió posteriormente a la aparición de TADB, RASTA y el estudio de Leplae y colaboradores); ii) que dichas bases de datos tampoco contenían algunos sistemas TA tipo II cuyos atributos se escapaban a la regla general, o que no habían sido anotados en dichas bases de datos por haber aparecido más recientemente; iii) que la identificación de sistemas TA tipo I descrita por Fozo y colaboradores se había llevado a cabo en la cepa de *S. Typhimurium* LT2 y no en SL1344. Por tanto, se llevaron a cabo búsquedas adicionales tipo PSI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) utilizando como patrón de búsqueda la secuencia

¹⁶ BLOSUM: matriz de sustitución utilizada para el alineamiento de secuencias de proteínas. BLOSUM puntúa alineamientos entre secuencias de proteínas evolutivamente divergentes basándose en alineamientos locales, en los que se compara las frecuencias relativas de aparición de los aminoácidos y las probabilidades de sustitución entre ellos (210 posibles sustituciones de los 20 aminoácidos estándar). Existen bastantes conjuntos de matrices BLOSUM que utilizan diferentes bases de datos de alineamientos, y que se nombran con números. Las BLOSUM seguidas de un número alto están diseñadas para comparar secuencias cercanamente relacionadas, mientras que las BLOSUM con número bajo están diseñadas para comparar secuencias relacionadas de forma distante.

de multitud de sistemas TA descritos en la literatura y que habían sido analizados funcionalmente (Tabla 3). Adicionalmente, se consultaron las bases de datos establecidas por Blower y colaboradores, en cuyo trabajo se describen nuevas familias de sistemas TA tipo III (Blower y col., 2012).

Tabla 3. Componentes de los distintos sistemas TA empleados para la búsqueda iterativa por PSI-BLAST.

Proteína	Toxina (T) antitoxina (A)	Tipo de sistema	Nº accesión (UNIPROT)	Organismo	Actividad de la proteína (*)
BsrG	T	I	L8EAY0	<i>Bacillus subtilis</i>	Ataca la membrana bacteriana
CcdA	A	II	P62552	<i>E. coli</i> plasmido F	-
CcdB	T	II	P62554	<i>E. coli</i> plasmido F	Inhibidor de la ADN girasa
ChpB	T	II	P33647	<i>E. coli</i> K-12	mARNasa
DinJ	A	II	Q47150	<i>E. coli</i> K-12	-
YafQ	T	II	Q47149	<i>E. coli</i> K-12	mARNasa
GhoS	A	V	P0AF61	<i>E. coli</i> K-12	mARNasa
GhoT	T	V	P64646	<i>E. coli</i> K-12	mARNasa
HicA	T	II	P76106	<i>E. coli</i> K-12	mARNasa
HicB	A	II	P67697	<i>E. coli</i> K-12	-
HigA	A	II	P67701	<i>E. coli</i> K-12	-
HigB	T	II	P64578	<i>E. coli</i> K-12	mARNasa
HipA	T	II	P23874	<i>E. coli</i> K-12	Serin/treonin quinasa
HipB	A	II	P23873	<i>E. coli</i> K-12	-
Hok	T	I	P11895	<i>E. coli</i> K-12 plasmido R1	Ataca la membrana bacteriana
IbsA	T	I	C1P607	<i>E. coli</i> K-12	Ataca la membrana bacteriana
LdrD	T	I	Q6BF25	<i>E. coli</i> K-12	Ataca la membrana bacteriana
LsoA	T	II	O82881	<i>E. coli</i> O157:H7 plasmido pOSAK1	mARNasa
LsoB	A	II	Q7DKW4	<i>E. coli</i> O157:H7 plasmido pOSAK1	-
MazE	A	II	P0AE72	<i>E. coli</i> K-12	-
MazF	T	II	P0AE70	<i>E. coli</i> K-12	mARNasa
MqsA	A	II	Q46864	<i>E. coli</i> K-12	-
MqsR	T	II	Q46865	<i>E. coli</i> K-12	mARNasa
PezA	A	II	Q97QZ2	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
PezT	T	II	Q97QZ1	<i>S. pneumoniae</i>	UDP-N-acetylglucosamín quinasa
PasT	T	II	P0AGL5	<i>E. coli</i> K-12	Inhibidor de la asociación de las subunidades ribosomales

MATERIALES Y MÉTODOS

Proteína	Toxina (T) antitoxina (A)	Tipo de sistema	Nº accesión (UNIPROT)	Organismo	Actividad de la proteína (*)
PasI	A	II	P52119	<i>E. coli</i> K-12	-
RelB	A	II	P0C079	<i>E. coli</i> K-12	-
RelE	T	II	P0C077	<i>E. coli</i> K-12	mARNasa
RnlA	T	II	P52129	<i>E. coli</i> K-12	mARNasa
ShoB	T	I	C1P611	<i>E. coli</i> K-12	Ataca la membrana bacteriana
SymE	T	I		<i>E. coli</i> K-12	mARNasa
ToxN	T	III	B8X820	<i>Pectobacterium atrosepticum</i> (<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>) plásmido pECA1039	mARNasa
YafN	A	II	Q47156	<i>E. coli</i> K-12	-
YafO	T	II	Q47157	<i>E. coli</i> K-12	mARNasa
YafQ	T	II	Q47149	<i>E. coli</i> K-12	mARNasa
YafW	A	IV	Q47684	<i>E. coli</i> K-12	-
YeeU	A	IV	P76364	<i>E. coli</i> K-12	-
YeeV (CbtA)	T	IV	P64524	<i>E. coli</i> K-12	Inhibidor de la división celular
YefM	A	II	P69346	<i>E. coli</i> K-12	-
YhaV	T	II	P64594	<i>E. coli</i> K-12	mARNasa
Ykfl	T	IV	P77692	<i>E. coli</i> K-12	Inhibidor de la división celular
YoeB	T	II	P69348	<i>E. coli</i> K-12	mARNasa
ε	A	II	Q57231	<i>Streptococcus pyogenes</i> plásmido pSM19035	-
ζ	T	II	Q54944	<i>S. pyogenes</i> plásmido pSM19035	UDP-N-acetylglucosamín quinasa

(*) “ - ” refiere a proteínas sin actividad enzimática demostrada.

Análisis genómico comparativo entre *S. Typhimurium* SL1344 y *S. bongori*.

Para determinar la distribución filogenética de los 27 sistemas TA identificados en *S. Typhimurium* SL1344, se consultó la base de datos de un reciente estudio genómico comparativo (Nuccio y Bäumler, 2014). En este estudio se habían analizado 15 genomas de diferentes serovares de *S. enterica*, la mayoría asociados a infecciones intestinales o extraintestinales. Determinados sistemas TA descritos en la presente Tesis Doctoral no aparecían en dicho estudio debido a que no estaban anotados como genes en el genoma de *S. Typhimurium* LT2. Este fue el caso de la mayoría de sistemas TA tipo I, o de aquellos localizados en el plásmido pCol1B9, presente en la estirpe SL1344 pero ausente en la estirpe LT2. Además, se quiso comparar la distribución de los módulos TA identificados en este trabajo con dos cepas cuyos genomas se encontraban secuenciados de la especie no patógena *S. bongori*. Para completar la búsqueda se usó la opción *TBLASTN* del NCBI

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), que permite buscar posibles secuencias de ADN codificantes de una secuencia de aminoácidos determinada. Sólo se consideraron positivos aquellos alineamientos con un $\text{valore-}e$ menor que 10^{-5} , y con una cobertura de la proteína de 30 o más aminoácidos (parámetros estándar para este tipo de análisis de secuencias). En el caso de las toxinas de los sistemas TA tipo I cuya secuencia de aminoácidos fue inferior a 30 aminoácidos, únicamente se tomó como parámetro de selección el $\text{valore-}e$. Los serovares y estirpes cuyo genoma fue empleado en este estudio comparativo incluyen: *S. Typhimurium* SL1344; *S. Typhimurium* LT2; *S. Newport* SL254; *S. Heildeberg* SL476; *S. Schwarzengrund* CVM19633; *S. Agona* SL483; *S. Enteritidis* P125109; *S. Paratyphi B* SP87; *S. Typhi* CT18; *S. Typhi* Ty2; *S. Paratyphi A* ATCC9150; *S. Paratyphi A* AKU_12601; *S. Dublin* CT_02021853; *S. Gallinarum* 287/91; *S. Choleraesuis* SC-B67; *S. Paratyphi C* RKS4594; *S. bongori* N268-08; *S. bongori* NCTC12419.

Análisis estadístico de los datos.

Los datos se analizaron con el programa estadístico GraphPad Prism (GraphPad Inc., San Diego, CA) usando ANOVA de una vía con el post-test de Dunnet o t de student. P valores inferiores a 0,05 fueron considerados como estadísticamente significativos.

Comparación de secuencias de proteínas.

Para los alineamientos de secuencias de aminoácidos de las proteínas se usó el programa ClustalX v.2.0 (Larkin y col., 2007).

Análisis y comparación de secuencias de ADN.

Para el diseño de oligonucleótidos y análisis de secuencia en el genoma de *S. Typhimurium* SL1344 se usaron los programas Clone Manager v7 (Sci-Ed Software, Morrisville, USA), BioEdit Sequence Alignment Editor v.7 (Ibis Biosciences, Carlsbad) y Artemis (Wellcome Trust Sanger Institute, England).

Análisis de los datos de proteómica.

Todos los datos procedentes de los espectros de masas obtenidos en los ensayos de proteómica se analizaron con el programa Proteome Discoverer v.1.3.0.339 (Thermo Fisher, San Jose, CA) usando su motor de búsqueda estándar *Sequest*. Los espectros MS/MS se enfrentaron a una base de datos que contenía el total de secuencias de aminoácidos correspondientes a todas las toxinas y antitoxinas identificadas en el genoma de *S. Typhimurium* SL1344 (ANEXO III). Los parámetros de búsqueda incluyeron un máximo de dos sitios de corte no procesados por tripsina, carbamidometilación de cisteínas (como modificaciones fijas), así como oxidación de metioninas (como modificaciones

MATERIALES Y MÉTODOS

variables). La tolerancia de los precursores y masa de los fragmentos se fijaron 10 ppm y 0,8 Da, respectivamente. Los péptidos identificados se filtraron usando la opción *Percolator* (Kall y col., 2007) con una tasa de *false discovery* fijada en 0,01.

RESULTADOS

Identificación de sistemas toxina-antitoxina en el genoma de S. Typhimurium SL1344.

En este trabajo se seleccionó la estirpe SL1344 de *S. Typhimurium* en base a varios criterios: i) la patogénesis de esta estirpe ha sido ampliamente caracterizada en modelos de infección *in vitro* e *in vivo* (Wray y Sojka, 1978, Jones y col., 1994, Aiastui y col., 2010, Nuñez-Hernández y col., 2013); ii) la disponibilidad de la secuencia completa de su genoma; iii) su incrementada virulencia en el modelo de ratón respecto a otras estirpes (Wray y Sojka, 1978, Patterson y col., 2012, Herrero-Fresno y col., 2014).

El primer objetivo fue identificar los sistemas TA codificados en el genoma de *S. Typhimurium* SL1344. El procedimiento empleado para en esta búsqueda se esquematiza en la Figura 6A. Se emplearon varias bases de datos y aplicaciones informáticas presentes al comienzo de este estudio, así como otras que aparecieron en el transcurso del mismo. En un primer paso se consultaron las bases de datos de sistemas TA tipo I (Fozo y col., 2010) y la base de datos TADB o “*Toxin-Antitoxin Data Base*” para los sistemas TA tipo II (Shao y col., 2011). Cuando aparecieron estos estudios, aun no se había completado la secuenciación de SL1344 (secuenciación terminada el 23 de marzo de 2012 por *The Wellcome Trust Sanger Institute*; <http://www.sanger.ac.uk/Projects/Salmonella>). Debido a ello, las bases de datos de sistemas TA tipo I y II sólo contenían información de la estirpe ya secuenciada *S. Typhimurium* LT2 (McClelland y col., 2001). Esta estirpe, aun conociendo posteriormente su alta similitud de genoma comparado a SL1344, difiere parcialmente de ésta (Kingsley y col., 2013, Pang y col., 2013). Por ejemplo, los plásmidos pCol1B9 o pRSF1010 que posee *S. Typhimurium* SL1344 están ausentes en LT2.

En referencia a los sistemas TA tipo I, se identificaron cinco posibles candidatos, presentes en los genomas de LT2 y SL1344: *ibsA-sibA*, *ibsB-sibB*, *ldrA-rdlA*, *ldrB-rdlB* y *tisB-istR* (Figura 6B). Para identificar los sistemas TA tipo II se usó la opción WU-BLAST de TADB v1.1 directamente sobre el genoma de *S. Typhimurium* SL1344. Se identificaron 19 candidatos: *dinJ-yafQ*, *ccdAB*, *higBA*, *parDE*, *phd-doc*, *relBE*, *relBE2*, *relBE3*, *relBE4*, *sehAB*, *sehCD*, *shpAB*, *ta1*, *ta2*, *ta3*, *ta4*, *ta5*, *vapBC* y *vapBC2* (Figura 6B).

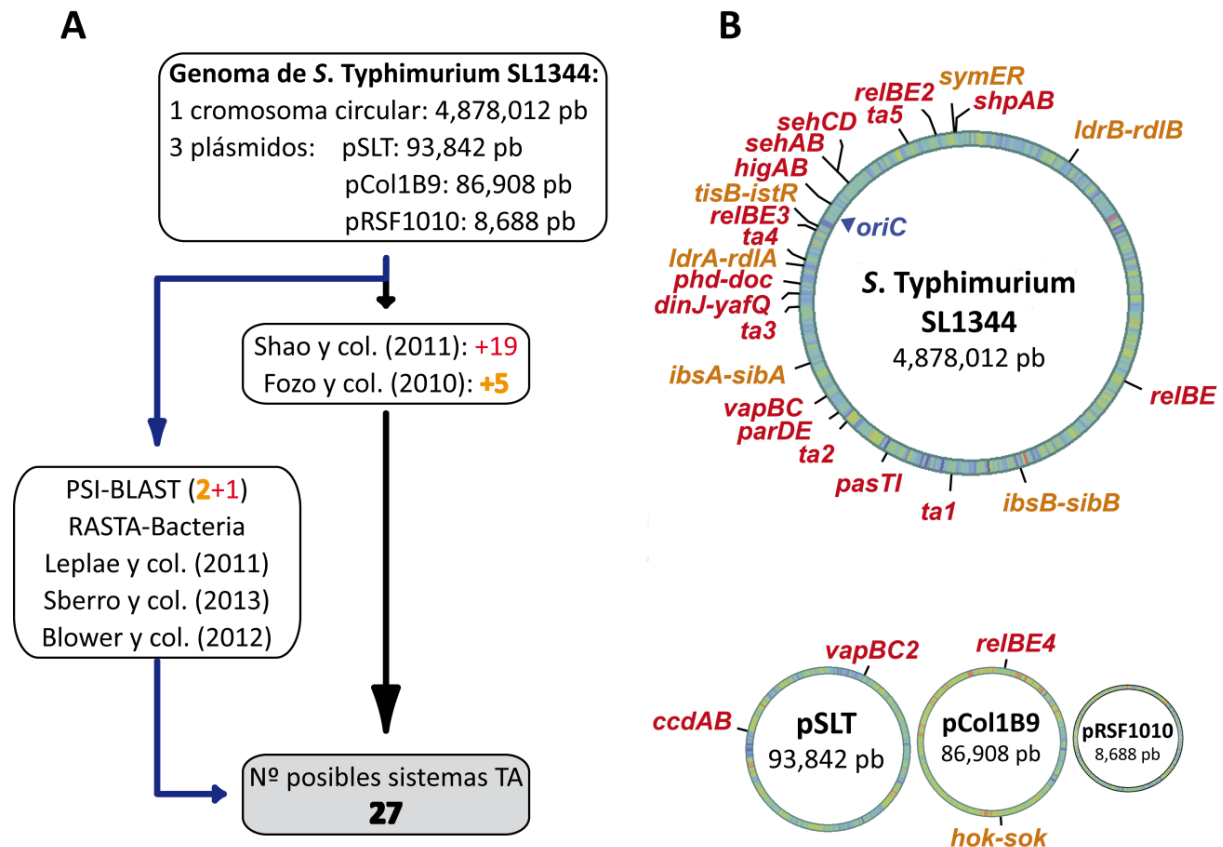


Figura 6. Identificación de 27 posibles sistemas TA en el genoma de *S. Typhimurium* SL1344. A) Procedimiento seguido para la búsqueda informática de los módulos TA. Se esquematizan los pasos más relevantes. B) Distribución de los diversos sistemas TA encontrados en el genoma de *S. Typhimurium* SL1344. Únicamente se encontraron módulos TA tipo I (naranja) y tipo II (rojo). Cabe destacar la concentración de sistemas TA en la región circundante al origen de replicación del cromosoma *oriC*, y la presencia de cuatro sistemas TA codificados en dos de los tres plásmidos (pSLT y pCol1B9).

Con el objeto de identificar el mayor número posible de sistemas TA en el genoma de *S. Typhimurium* SL1344 se realizaron los siguientes análisis complementarios:

- Búsquedas tipo PSI-BLAST utilizando como patrón de búsqueda la secuencia de sistemas TA descritos en la literatura (tipo I, II, III, IV y V) y de los que existían estudios funcionales (Tabla 3). Este motor de búsqueda permite, a través de búsquedas iterativas, encontrar proteínas de función similar con una secuencia de aminoácidos diferente. Los parámetros de búsqueda se ajustaron a los descritos previamente en la literatura (Leplae y col., 2011).
- Búsqueda de sistemas TA tipo II a través de la aplicación RASTA-Bacteria (<http://genoweb1.irisa.fr/duals/RASTA-Bacteria/>).

- Consulta de nuevas bases de datos de sistemas TA tipo II como la descrita por Leplae y colaboradores (Leplae y col., 2011) y Sberro y colaboradores (Sberro y col., 2013) para nuevos sistemas TA tipo II.
- Consulta de bases de datos donde se describen nuevos sistemas TA tipo III (Blower y col., 2012).

Tras estos análisis posteriores en *S. Typhimurium* SL1344, únicamente se encontraron tres nuevos candidatos de sistemas TA mediante PSI-BLAST: dos sistemas de tipo I (*symER_{ST}* y *hok-sok_{ST}*) y un sistema tipo II (*pasTI_{ST}*). Al comparar nuestros resultados con estudios previos (Leplae y col., 2011), fue evidente que la búsqueda con TADB proporcionó un mayor número de sistemas TA que los previamente descritos. Además, algunos sistemas TA anotados en esos estudios eran genes caracterizados con funciones distintas a los sistemas TA, por lo que fueron descartados.

En su totalidad se identificaron 27 posibles sistemas toxina-antitoxina: 20 tipo II y 7 tipo I (Figura 6B y Tabla 4), no encontrándose ningún sistema TA perteneciente a los tipos III, IV y V. Como muestra la Figura 6B, la mayoría de sistemas se concentran en una región concreta del cromosoma, y sólo cuatro de ellos se localizan en los plásmidos: dos en el plásmido de virulencia pSLT, y dos en pCol1B9.

Durante esta búsqueda quedó patente la disparidad de nomenclatura existente en estos sistemas. Existen diversos ejemplos en los que un mismo sistema se ha nombrado de distinta manera. Por ejemplo, el sistema *kis-kid* del plásmido R1 y *pemIK* del plásmido R100 de *E. coli* (Bravo y col., 1987, Tsuchimoto y Ohtsubo, 1989), o más recientemente *sehAB* y *sehCD* de *S. Typhimurium*, catalogados como sistemas *higBA* en otro estudio (De la Cruz y col., 2013, Helaine y col., 2014). Para evitar esta confusión en el campo, se adoptó una nomenclatura basada en los siguientes criterios:

- En aquellos sistemas TA homólogos a sistemas previamente descritos y caracterizados experimentalmente se conservó el nombre original. Dentro de este grupo se encuentran *dinJ-yafQ*, *ccdAB*, *hok-sok*, *ibsA-sibA*, *ibsB-sibB*, *ldrA-rdIA*, *ldrB-rdIB*, *phd-doc*, *pasTI*, *relBE*, *relBE2*, *symER*, *tisB-istR*, *vapBC* y *vapBC2*.
- En aquellos sistemas que no poseían homología con sistemas clásicos, pero que si presentaban dominios toxina/antitoxina conservados, se les asignó el nombre de los sistemas que por secuencia se amoldaban mejor a esos dominios. Este fue el caso de *parDE*, *higBA*, *relBE3* y *relBE4*.
- En aquellos sistemas TA caracterizados funcionalmente y a los que se les había asignado en otros estudios un nombre, se mantuvo esa nomenclatura. Tales fueron los casos de *shpAB*, *sehAB* y *sehCD*.

- Al resto de sistemas TA en los que la aplicación TADB no detectó homología de secuencia con ningún sistema TA experimentalmente validado, que no habían sido descritos previamente, y que no pudieron ser clasificados dentro de ninguna familia de sistemas TA clásicos, se nombraron como sistemas toxina “t” antitoxina “a”. Esta designación incluye un número que indica su orden en el genoma de *S. Typhimurium* SL1344: *ta1*, *ta2*, *ta3*, *ta4* y *ta5* (Figura 6 y Tabla 4).
- Para indicar que el conjunto de 27 sistemas TA identificados pertenecen a *S. Typhimurium* se añadió el subíndice “ST” al nombre de cada gen o proteína. Por ejemplo, sistema *ccdAB_{ST}* o toxina T4_{ST}.

S. Typhimurium SL1344 contiene un elevado número de sistemas TA funcionales.

Una tarea importante en la investigación de sistemas TA es reducir el desfase generado entre los módulos TA identificados informáticamente y los validados experimentalmente. Tras la predicción de 27 posibles sistemas TA en el genoma de *S. Typhimurium* SL1344 se planteó como objetivo su estudio funcional. Para este fin se diseñaron dos vectores de expresión compatibles y con promotores inducibles por IPTG o arabinosa. Este diseño permitía la síntesis controlada de las toxinas y antitoxinas (Figura 7, Anexo I), valorando independientemente la funcionalidad de cada componente del sistema TA. Como indicadores de funcionalidad de los módulos TA clonados, se emplearon dos características distintivas de estos sistemas: la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano (toxina) y la capacidad para neutralizar el efecto bacteriostático/bactericida de la toxina (antitoxina).

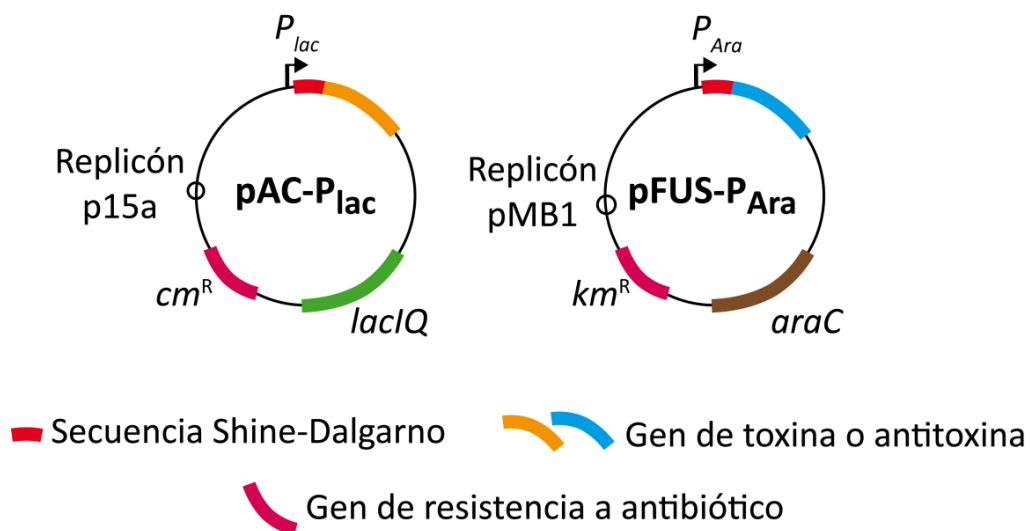


Figura 7. Vectores diseñados para la expresión selectiva de los genes codificantes de toxinas y antitoxinas. Se emplearon dos vectores compatibles, con distinta resistencia a antibiótico (kanamicina y cloranfenicol), en los que se clonó un promotor P_{lac} inducible por IPTG (pAC- P_{lac} , izquierda) o P_{Ara} inducible por arabinosa (pFUS- P_{Ara} , derecha).

Tabla 4. Características de los 27 posibles sistemas TA codificados en el genoma de la estirpe *S. Typhimurium* SL1344.

Dominio Toxina-Antitoxina*	Familia [†]	Tipo de sistema TA	Gen [§]	Anotación en SL1344	Anotación en LT2	Coordenadas en el genoma de <i>S. Typhimurium</i> SL1344	Orientación (cadena)	Método de identificación
Dominio similar a Xre	–	II	<i>a1</i>	SL2379	STM2413	2527069- 2527825	Codificante	(Shao y col., 2011)
Dominio similar a Xre			<i>t1</i>	SL2380	STM2414			
Dominio similar a RHH	–	II	<i>a2</i>	SL2884	STM2904	3069908- 3070722	Codificante	(Shao y col., 2011)
Dominio similar a GNAT			<i>t2</i>	SL2885	STM2905			
Dominio similar a RHH	<i>parDE</i>	II	<i>parD</i>	SL2936	STM2955.S	3124178- 3123641	Complementaria	(Shao y col., 2011)
Dominio similar a ReE			<i>parE</i>	SL2935	STM2954.1n			
Dominio similar a YhfG	–	II	<i>a3</i>	SL3438	STM3471	3642596- 3641837	Complementaria	(Shao y col., 2011)
Dominio similar a Fic			<i>t3</i>	SL3437	STM3470			
Dominio similar a RHH	–	II	<i>a4</i>	SL3618	STM3652	3859811- 3859051	Complementaria	(Shao y col., 2011)
Dominio similar a GNAT			<i>t4</i>	SL3617	STM3651			
Dominio similar a Xre	<i>relBE</i>	II	<i>relB3</i>	SL3744	STM3778	4000107- 4000773	Codificante	(Shao y col., 2011)
Dominio similar a ReE			<i>relE3</i>	SL3743	STM3777			
Dominio similar a Xre	<i>(higBA)</i> <i>relBE</i>	II	<i>sehB</i>	SL3976	STM4030.S	4261841- 4261087	Complementaria	(Shao y col., 2011)
Dominio similar a ReE			<i>sehA</i>	SL3977	STM4031			
Dominio similar a Xre	<i>(higBA)</i> <i>relBE</i>	II	<i>sehD</i>	SL3980	STM4033	4263074- 4263676	Codificante	(Shao y col., 2011)
Dominio similar a ReE			<i>sehC</i>	SL3979	STM4032.2N			
Dominio similar a RHH	–	II	<i>a5</i>	SL4253	STM4317	4583140- 4583921	Codificante	(Shao y col., 2011)
Dominio similar a GNAT			<i>t5</i>	SL4254	STM4318			

Dominio Toxina-Antitoxina*	Familia [†]	Tipo de sistema TA	Gen [§]	Anotación en SL1344	Anotación en LT2	Coordenadas en el genoma de <i>S. Typhimurium</i> SL1344	Orientación (cadena)	Método de identificación																																																																																																			
Dominio similar a RHH	–	II	<i>shpB</i>	SL4460	STM4529	4806232- 4806808	Codificante	(Shao y col., 2011)																																																																																																			
Dominio similar a COG2929			<i>shpA</i>	SL4459	STM4528				Dominio similar a RHH	<i>relBE</i>	II	<i>relB4</i>	SLP2_0003	SLP2_0003	2395- 2942	Complementaria	(Shao y col., 2011)	Dominio similar a RelE	<i>relE4</i>	SLP2_0004	SLP2_0004	Dominio similar a MazF	<i>ccd</i>	II	<i>ccdB</i>	PSLT028	PSLT028	73746- 73221	Complementaria	(Shao y col., 2011)	Dominio similar a RHH	<i>ccdA</i>	PSLT027	PSLT027	Dominio similar a RHH	<i>relBE</i>	II	<i>dinJ</i>	SL3484	STM3517	3701753- 3701215	Complementaria	(Shao y col., 2011)	Dominio similar a RelE	<i>yafQ</i>	SL3483	STM3516	Dominio similar a Phd	<i>phd-doc</i>	II	<i>phd</i>	SL3525	STM3559	3749850- 3749258	Complementaria	(Shao y col., 2011)	Dominio similar a Fic	<i>doc</i>	SL3524	STM3558	Dominio similar a COG5606	(higBA) <i>relBE</i>	II	<i>higA</i>	SL3867	STM3907	4137213- 4137868	Codificante	(Shao y col., 2011)	Dominio similar a RelE	<i>higB</i>	SL3866	STM3906	–		II	<i>pasI</i>	SL2658	STM2686	2837522- 2836766	Complementaria	PSI-BLAST	–	<i>pasT</i>	SL2659	STM2687	Dominio similar a Phd	<i>relBE</i>	II	<i>relB</i>	SL1480	STM1551	1583940- 1583418	Complementaria	(Shao y col., 2011)	Dominio similar a RelE	<i>relE</i>	SL1479	STM1550	Dominio similar a RHH	<i>relBE</i>	II	<i>relB2</i>	SL4379	STM4449	4712031- 4712547	Codificante
Dominio similar a RHH	<i>relBE</i>	II	<i>relB4</i>	SLP2_0003	SLP2_0003	2395- 2942	Complementaria	(Shao y col., 2011)																																																																																																			
Dominio similar a RelE			<i>relE4</i>	SLP2_0004	SLP2_0004				Dominio similar a MazF	<i>ccd</i>	II	<i>ccdB</i>	PSLT028	PSLT028	73746- 73221	Complementaria	(Shao y col., 2011)	Dominio similar a RHH	<i>ccdA</i>	PSLT027	PSLT027	Dominio similar a RHH	<i>relBE</i>	II	<i>dinJ</i>	SL3484	STM3517	3701753- 3701215	Complementaria	(Shao y col., 2011)	Dominio similar a RelE	<i>yafQ</i>	SL3483	STM3516	Dominio similar a Phd	<i>phd-doc</i>	II	<i>phd</i>	SL3525	STM3559	3749850- 3749258	Complementaria	(Shao y col., 2011)	Dominio similar a Fic	<i>doc</i>	SL3524	STM3558	Dominio similar a COG5606	(higBA) <i>relBE</i>	II	<i>higA</i>	SL3867	STM3907	4137213- 4137868	Codificante	(Shao y col., 2011)	Dominio similar a RelE	<i>higB</i>	SL3866	STM3906	–		II	<i>pasI</i>	SL2658	STM2686	2837522- 2836766	Complementaria	PSI-BLAST	–	<i>pasT</i>	SL2659	STM2687	Dominio similar a Phd	<i>relBE</i>	II	<i>relB</i>	SL1480	STM1551	1583940- 1583418	Complementaria	(Shao y col., 2011)	Dominio similar a RelE	<i>relE</i>	SL1479	STM1550	Dominio similar a RHH	<i>relBE</i>	II	<i>relB2</i>	SL4379	STM4449	4712031- 4712547	Codificante	(Shao y col., 2011)	Dominio similar a RelE	<i>relE2</i>	SL4380	STM4450								
Dominio similar a MazF	<i>ccd</i>	II	<i>ccdB</i>	PSLT028	PSLT028	73746- 73221	Complementaria	(Shao y col., 2011)																																																																																																			
Dominio similar a RHH			<i>ccdA</i>	PSLT027	PSLT027				Dominio similar a RHH	<i>relBE</i>	II	<i>dinJ</i>	SL3484	STM3517	3701753- 3701215	Complementaria	(Shao y col., 2011)	Dominio similar a RelE	<i>yafQ</i>	SL3483	STM3516	Dominio similar a Phd	<i>phd-doc</i>	II	<i>phd</i>	SL3525	STM3559	3749850- 3749258	Complementaria	(Shao y col., 2011)	Dominio similar a Fic	<i>doc</i>	SL3524	STM3558	Dominio similar a COG5606	(higBA) <i>relBE</i>	II	<i>higA</i>	SL3867	STM3907	4137213- 4137868	Codificante	(Shao y col., 2011)	Dominio similar a RelE	<i>higB</i>	SL3866	STM3906	–		II	<i>pasI</i>	SL2658	STM2686	2837522- 2836766	Complementaria	PSI-BLAST	–	<i>pasT</i>	SL2659	STM2687	Dominio similar a Phd	<i>relBE</i>	II	<i>relB</i>	SL1480	STM1551	1583940- 1583418	Complementaria	(Shao y col., 2011)	Dominio similar a RelE	<i>relE</i>	SL1479	STM1550	Dominio similar a RHH	<i>relBE</i>	II	<i>relB2</i>	SL4379	STM4449	4712031- 4712547	Codificante	(Shao y col., 2011)	Dominio similar a RelE	<i>relE2</i>	SL4380	STM4450																					
Dominio similar a RHH	<i>relBE</i>	II	<i>dinJ</i>	SL3484	STM3517	3701753- 3701215	Complementaria	(Shao y col., 2011)																																																																																																			
Dominio similar a RelE			<i>yafQ</i>	SL3483	STM3516				Dominio similar a Phd	<i>phd-doc</i>	II	<i>phd</i>	SL3525	STM3559	3749850- 3749258	Complementaria	(Shao y col., 2011)	Dominio similar a Fic	<i>doc</i>	SL3524	STM3558	Dominio similar a COG5606	(higBA) <i>relBE</i>	II	<i>higA</i>	SL3867	STM3907	4137213- 4137868	Codificante	(Shao y col., 2011)	Dominio similar a RelE	<i>higB</i>	SL3866	STM3906	–		II	<i>pasI</i>	SL2658	STM2686	2837522- 2836766	Complementaria	PSI-BLAST	–	<i>pasT</i>	SL2659	STM2687	Dominio similar a Phd	<i>relBE</i>	II	<i>relB</i>	SL1480	STM1551	1583940- 1583418	Complementaria	(Shao y col., 2011)	Dominio similar a RelE	<i>relE</i>	SL1479	STM1550	Dominio similar a RHH	<i>relBE</i>	II	<i>relB2</i>	SL4379	STM4449	4712031- 4712547	Codificante	(Shao y col., 2011)	Dominio similar a RelE	<i>relE2</i>	SL4380	STM4450																																		
Dominio similar a Phd	<i>phd-doc</i>	II	<i>phd</i>	SL3525	STM3559	3749850- 3749258	Complementaria	(Shao y col., 2011)																																																																																																			
Dominio similar a Fic			<i>doc</i>	SL3524	STM3558				Dominio similar a COG5606	(higBA) <i>relBE</i>	II	<i>higA</i>	SL3867	STM3907	4137213- 4137868	Codificante	(Shao y col., 2011)	Dominio similar a RelE	<i>higB</i>	SL3866	STM3906	–		II	<i>pasI</i>	SL2658	STM2686	2837522- 2836766	Complementaria	PSI-BLAST	–	<i>pasT</i>	SL2659	STM2687	Dominio similar a Phd	<i>relBE</i>	II	<i>relB</i>	SL1480	STM1551	1583940- 1583418	Complementaria	(Shao y col., 2011)	Dominio similar a RelE	<i>relE</i>	SL1479	STM1550	Dominio similar a RHH	<i>relBE</i>	II	<i>relB2</i>	SL4379	STM4449	4712031- 4712547	Codificante	(Shao y col., 2011)	Dominio similar a RelE	<i>relE2</i>	SL4380	STM4450																																															
Dominio similar a COG5606	(higBA) <i>relBE</i>	II	<i>higA</i>	SL3867	STM3907	4137213- 4137868	Codificante	(Shao y col., 2011)																																																																																																			
Dominio similar a RelE			<i>higB</i>	SL3866	STM3906				–		II	<i>pasI</i>	SL2658	STM2686	2837522- 2836766	Complementaria	PSI-BLAST	–	<i>pasT</i>	SL2659	STM2687	Dominio similar a Phd	<i>relBE</i>	II	<i>relB</i>	SL1480	STM1551	1583940- 1583418	Complementaria	(Shao y col., 2011)	Dominio similar a RelE	<i>relE</i>	SL1479	STM1550	Dominio similar a RHH	<i>relBE</i>	II	<i>relB2</i>	SL4379	STM4449	4712031- 4712547	Codificante	(Shao y col., 2011)	Dominio similar a RelE	<i>relE2</i>	SL4380	STM4450																																																												
–		II	<i>pasI</i>	SL2658	STM2686	2837522- 2836766	Complementaria	PSI-BLAST																																																																																																			
–			<i>pasT</i>	SL2659	STM2687				Dominio similar a Phd	<i>relBE</i>	II	<i>relB</i>	SL1480	STM1551	1583940- 1583418	Complementaria	(Shao y col., 2011)	Dominio similar a RelE	<i>relE</i>	SL1479	STM1550	Dominio similar a RHH	<i>relBE</i>	II	<i>relB2</i>	SL4379	STM4449	4712031- 4712547	Codificante	(Shao y col., 2011)	Dominio similar a RelE	<i>relE2</i>	SL4380	STM4450																																																																									
Dominio similar a Phd	<i>relBE</i>	II	<i>relB</i>	SL1480	STM1551	1583940- 1583418	Complementaria	(Shao y col., 2011)																																																																																																			
Dominio similar a RelE			<i>relE</i>	SL1479	STM1550				Dominio similar a RHH	<i>relBE</i>	II	<i>relB2</i>	SL4379	STM4449	4712031- 4712547	Codificante	(Shao y col., 2011)	Dominio similar a RelE	<i>relE2</i>	SL4380	STM4450																																																																																						
Dominio similar a RHH	<i>relBE</i>	II	<i>relB2</i>	SL4379	STM4449	4712031- 4712547	Codificante	(Shao y col., 2011)																																																																																																			
Dominio similar a RelE			<i>relE2</i>	SL4380	STM4450																																																																																																						

Dominio Toxina-Antitoxina*	Familia [†]	Tipo de sistema TA	Gen [§]	Anotación en SL1344	Anotación en LT2	Coordenadas en el genoma de <i>S. Typhimurium</i> SL1344	Orientación (cadena)	Método de identificación
Dominio similar a AbrB	<i>vapBC</i>	II	<i>vapB</i>	SL3012	STM3034	3216651- 3215876	Complementaria	(Shao y col., 2011)
Dominio similar a PIN			<i>vapC</i>	SL3011	STM3033			
Dominio similar a AbrB	<i>vapBC</i>	II	<i>vapB2</i>	PSLT107	PSLT107	6736- 7364	Codificante	(Shao y col., 2011)
Dominio similar a PIN			<i>vapC2</i>	PSLT106	PSLT106			
–	<i>hok/gef</i>	I	<i>hok-sok</i>	–	–	41921- 42073	Codificante	PSI-BLAST
–	<i>ibs</i>	I	<i>ibsA-sibA</i>	–	–	3383044- 3383103	Codificante	(Fozo y col., 2010)
–	<i>ibs</i>	I	<i>ibsB-sibB</i>	–	–	2211602- 2211658	Codificante	(Fozo y col., 2010)
–	<i>ldr/fst</i>	I	<i>ldrA-rdIA</i>	–	–	3829510- 3829724	Complementaria	(Fozo y col., 2010)
–	<i>ldr/fst</i>	I	<i>ldrB-rdIB</i>	–	–	466721- 466936	Codificante	(Fozo y col., 2010)
–		I	<i>symER</i>	SL4454	STM4523	4798033- 4797630	Complementaria	PSI-BLAST
–	<i>tisB</i>	I	<i>tisB-istR</i>	–	–	4019333- 4019842	Codificante	(Fozo y col., 2010)

* Clasificación basada en los estudios de Makarova y colaboradores para los sistemas TA tipo II (Makarova y col., 2009), y Fozo y colaboradores para los sistemas TA tipo I (Fozo y col., 2010).

[†] Los sistemas no homólogos a familias descritas se marcan con “–”

[§] Nomenclatura basada en los sistemas previamente descritos en la literatura (Shao y col., 2011, Slattery y col., 2013, De la Cruz y col., 2013), dominios toxina-antitoxina y homología de secuencia. En los sistemas tipo I no se indican los códigos de acceso de los genes, por no estar estos anotados como tales en el genoma de *S. Typhimurium*. Las toxinas aparecen subrayadas.

RESULTADOS

Los ensayos funcionales implicaron la siembra en placas de LB-agar de diluciones seriadas de cultivos de *S. Typhimurium* SL1344 transformada con los plásmidos de expresión respectivos y crecidos hasta fase exponencial. Las placas contenían IPTG, arabinosa, ambos inductores o ninguno de ellos, con el fin de valorar independientemente la funcionalidad de cada componente del módulo TA. Estos ensayos demostraron que 18 de los 27 sistemas TA analizados se comportan como módulos TA funcionales (Figura 8A y 8B). Así, al inducir la toxina se observó una pérdida de viabilidad y/o cultivabilidad en el caso de los sistemas TA tipo I Hok_{ST}, lbsA_{ST}, LdrA_{ST}, LdrB_{ST}, TisB_{ST}, y los sistemas TA tipo II YafQ_{ST}, ParE_{ST}, Doc_{ST}, RelE_{ST}, RelE2_{ST}, RelE4_{ST}, ShpA_{ST}, SehC_{ST}, T2_{ST}, T3_{ST}, T4_{ST}, T5_{ST} y VapC2_{ST} (Figura 8A y 8B). La viabilidad y/o cultivabilidad se recuperó cuando se expresó simultáneamente la antitoxina correspondiente a cada sistema TA tipo II: DinJ_{ST}, ParD_{ST}, Phd_{ST}, RelB_{ST}, RelB2_{ST}, RelB4_{ST}, ShpB_{ST}, SehD_{ST}, A2_{ST}, A3_{ST}, A4_{ST}, A5_{ST} y VapB2_{ST}, respectivamente (Figura 8A). Sin embargo, se detectaron algunos sistemas TA que no fueron totalmente funcionales (Figura 8A), que se clasificaron en dos categorías: i) sistemas en los que la expresión simultánea de la antitoxina correspondiente no neutralizó el efecto bacteriostático/bactericida de la toxina (*ta1*_{ST} y *relBE3*_{ST}); ii) sistemas en los que la expresión de la toxina no afectó la capacidad de crecimiento de la bacteria en placa (*ccdAB*_{ST}, *ibsB-sibB*_{ST}, *higBA*_{ST}, *pasT1*_{ST}, *symER*_{ST}, *ta3*_{ST} y *vapBC*_{ST}).

Todos los ensayos funcionales se llevaron a cabo en la estirpe silvestre de *S. Typhimurium* SL1344, por lo que existía al menos una copia de todos los sistemas TA analizados en el genoma. Para descartar una posible interferencia de los módulos TA codificados en el genoma sobre los expresados desde los plásmidos, se repitieron los ensayos de toxicidad y neutralización en la estirpe MG1655 de *E. coli*. Estos ensayos se diseñaron sólo para los sistemas TA caracterizados como negativos en *S. Typhimurium* SL1344. En estas nuevas condiciones no se observó una ganancia en funcionalidad en ninguno de los sistemas TA probados. Asimismo, se analizó la funcionalidad del módulo *ccdAB*_{ST}, codificado en el plásmido de virulencia pSLT de *S. Typhimurium* SL1344, en la estirpe SV3081 de *S. Typhimurium* que no poseía dicho plásmido (Torreblanca y col., 1999). Estos ensayos mostraron una ausencia de actividad en la toxina CcdB_{ST}. Como conclusión, estos datos indicaron que la presencia en el genoma de *S. Typhimurium* SL1344 de una o más copias de los sistemas TA analizados no interfería en los ensayos de toxicidad y neutralización.

Análisis de la pérdida de actividad en determinadas toxinas y antitoxinas de S. Typhimurium.

Para identificar la posible causa de la falta de actividad en determinadas toxinas o antitoxinas se siguieron varias aproximaciones. Primero, se repitieron las clonaciones de los genes que codifican toxinas o antitoxinas no funcionales. Segundo, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica de dichos

sistemas así como alineamientos de secuencia entre dichos módulos y sus ortólogos identificados originalmente. Tercero, se clonaron los genes codificantes de las toxinas o antitoxinas no funcionales insertando etiquetas que permitiesen la inmunodetección de las correspondientes proteínas con anticuerpos. Cuarto, se examinó la morfología bacteriana tras inducir las toxinas no funcionales por microscopía óptica.

La ausencia de toxicidad o neutralización no se debe a un problema en los clones seleccionados.

Para descartar errores en la secuencia de los genes codificantes de las toxinas y antitoxinas, se secuenciaron todos los plásmidos recombinantes obtenidos. Aun así, se repitieron las clonaciones de genes codificantes de las toxinas y antitoxinas no funcionales utilizando los mismos plásmidos para destacar posibles mutaciones en las secuencias propias del vector. Los resultados obtenidos en los ensayos funcionales con estas nuevas versiones fueron igualmente negativos.

La ausencia de función de algunas toxinas se debe a mutaciones puntuales.

Toxina VapC_{ST}

El módulo cromosómico *vapBC_{ST}*, había sido caracterizado experimentalmente como un sistema TA funcional en *S. Typhimurium* LT2 (Winther y Gerdes, 2011). En su trabajo, Winter y Gerdes, demostraron que la proteína cromosómica VapC_{ST} tiene actividad tARNasa. Comparando las secuencias de aminoácidos del ortólogo de VapC_{ST} presente en *S. Typhimurium* LT2, se vio que las proteínas VapC_{ST} cromosómicas de las estirpes LT2 y SL1344 eran 100% idénticas. El fenotipo observado al inducir la expresión de la toxina VapC_{ST} fue una reducción en el tamaño y mucosidad de las colonias (Figura 9). Sorprendentemente, este fenotipo no se recuperó con la expresión simultánea de la antitoxina VapB_{ST} (Figura 9).

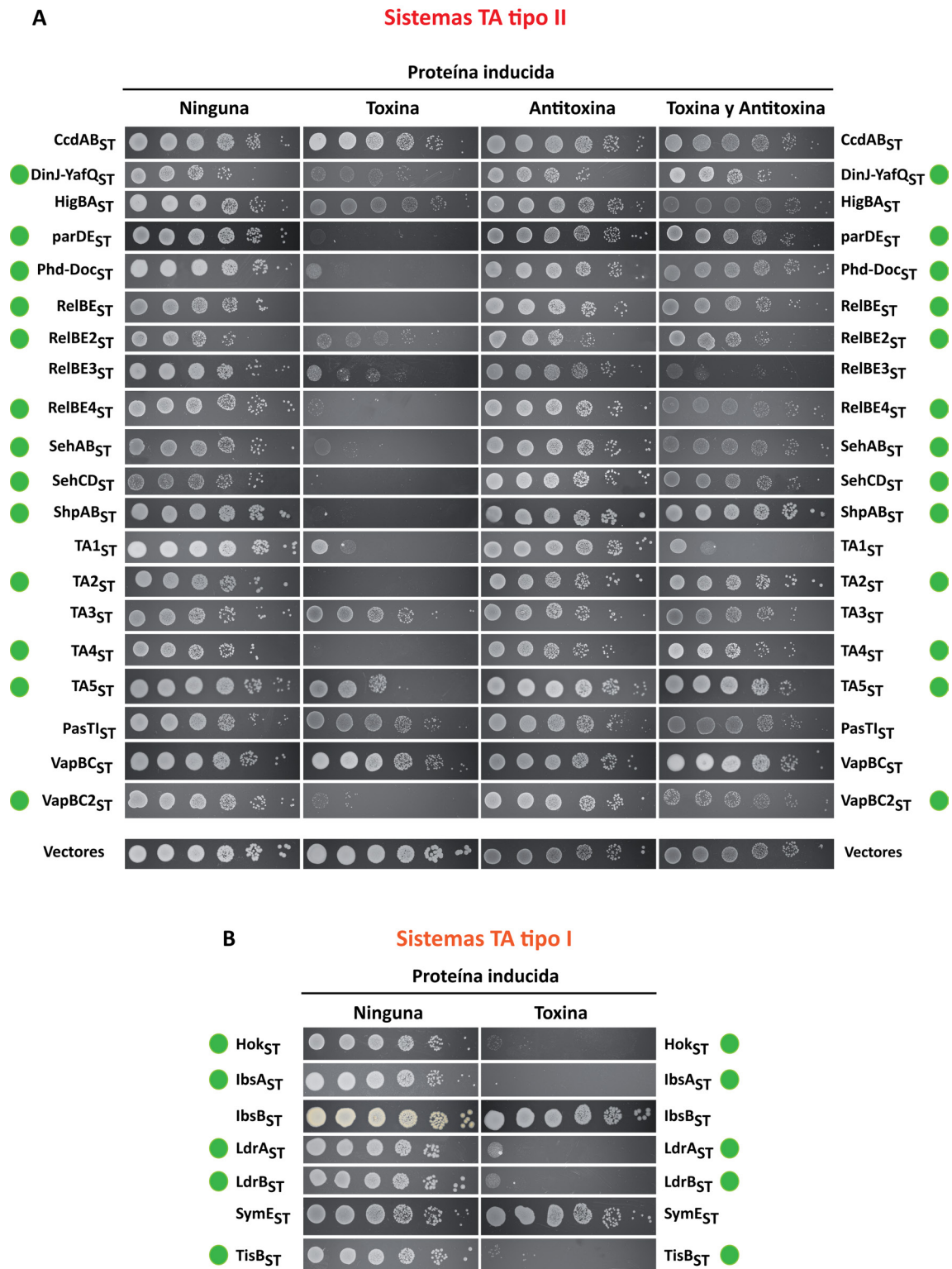


Figura 8. Ensayos funcionales demostraron que 18 de los 27 sistemas TA identificados en el genoma de *S. Typhimurium* SL1344 son funcionales. **A)** Sistemas TA tipo II, **B)** sistemas TA tipo I. Los sistemas considerados como positivos aparecen marcados con círculos verdes. La inducción de las toxinas funcionales da lugar a una pérdida de viabilidad y/o cultivabilidad, mientras que la expresión de las antitoxinas funcionales produce una recuperación del crecimiento.

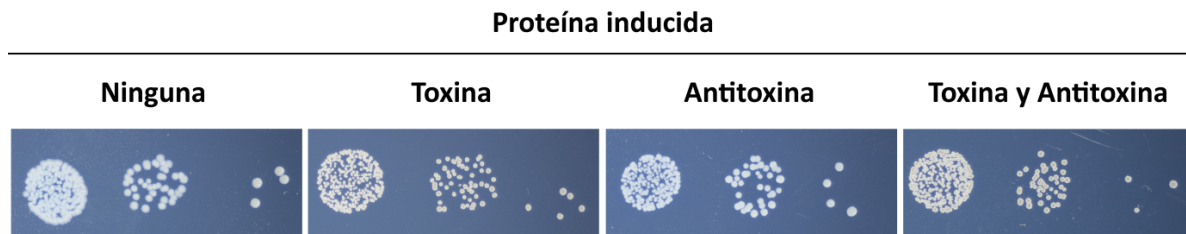


Figura 9. La expresión de la toxina VapC_{ST} de *S. Typhimurium* SL1344 da lugar a la aparición de colonias más pequeñas y menos mucosas. Detalle del fenotipo de las colonias obtenidas al inducir la toxina VapC_{ST} en los ensayos de toxicidad y neutralización. Se produjo un cambio en la morfología de las colonias en las placas en la que se indujo la expresión de la toxina VapC_{ST}. Este fenotipo alterado se mantuvo aun cuando se expresó simultáneamente su antitoxina VapB_{ST}.

Toxina CcdB_{ST}

Al igual que el sistema TA *vapBC*_{ST}, el módulo *ccdAB*_{ST}, aunque de una forma indirecta, había sido descrito también como un módulo TA funcional (García-Quintanilla y col., 2006). La delección de *ccdB*_{ST} produce una mayor inestabilidad del plásmido de virulencia pSLT, aumentando la frecuencia con la que *S. Typhimurium* lo pierde. Este fenómeno es una característica típica de la “adición plasmídica” generada por la presencia de un sistema TA funcional. Sin embargo, los ensayos funcionales aquí presentados demostraron que CcdB_{ST} no altera el crecimiento de *S. Typhimurium* SL1344. Al comparar la secuencia de la toxina CcdB_{ST} de *S. Typhimurium* con la proteína CcdB codificada en el plásmido F de *E. coli* se comprobó que ambas proteínas conservan un 83% de identidad (Figura 10A). Curiosamente, se detectó cambio en el aminoácido 99 (R99W), el cual es esencial para la actividad tóxica de CcdB, pues se requiere para la interacción toxina-ADN girasa y la inhibición de esta última (Bahassi y col., 1995, Dao-Thi y col., 2005). Se decidió revertir esta mutación en el vector de expresión donde se había clonado la toxina CcdB_{ST} original de *S. Typhimurium* SL1344, y ensayar la nueva variante en los ensayos de toxicidad y neutralización. Los resultados mostraron un claro aumento en la toxicidad de CcdB_{ST} (Figura 10B), que además fue neutralizable al expresar simultáneamente la antitoxina CcdA_{ST}.

RESULTADOS

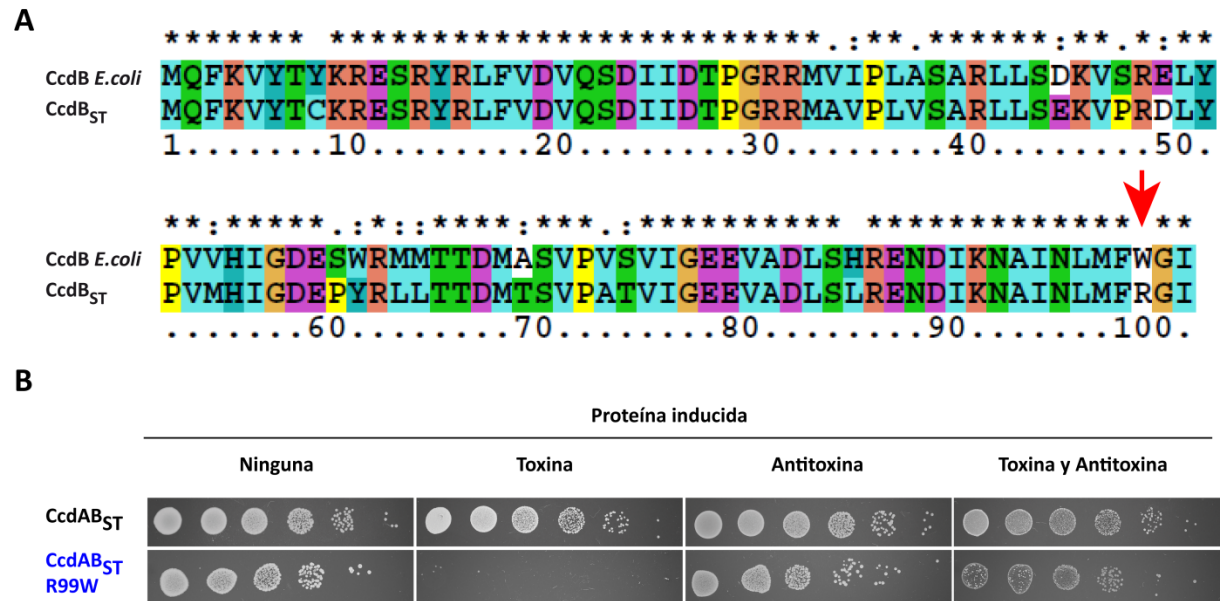


Figura 10. La ausencia de toxicidad en CcdB_{ST} se debe a una sustitución W99R en el aminoácido 99. A) Alineamiento de secuencia entre las proteínas CcdB de *E. coli* (parte superior) y CcdB_{ST} de *S. Typhimurium* SL1344 (parte inferior). Se indica con una flecha roja el residuo R99 responsable de la inactividad de CcdB_{ST}. Los asteriscos indican identidad de aminoácidos. **B)** Ensayos de toxicidad y neutralización con las variantes de CcdB_{ST} silvestre (arriba) y mutada (abajo). La reversión de la mutación W99R recupera el fenotipo tóxico de CcdB_{ST}, que además es neutralizable por la antitoxina CcdA_{ST}.

Toxina PasT_{ST}

Al comparar la toxina PasT_{ST} de *S. Typhimurium* con su ortólogo PasT en *E. coli* (Zhang y Inouye, 2011) se identificaron 19 cambios de aminoácido a lo largo la secuencia de la proteína (Figura 11A). Los primeros diez aminoácidos en el extremo N-terminal de PasT_{EC} se han demostrado esenciales para su toxicidad (Norton y Mulvey, 2012). Entre el total de sustituciones detectadas en la toxina PasT_{ST} de *S. Typhimurium* SL1344, cinco de estas se encuentran entre estos diez primeros aminoácidos esenciales para su toxicidad (Figura 11A corchete rojo). Se analizó por tanto si estas mutaciones en el extremo N-terminal podrían explicar la pérdida toxicidad en PasT_{ST}. Se detectó un incremento parcial en la toxicidad de PasT_{ST} al ajustar la secuencia de su extremo N-terminal a la de la proteína PasT_{EC} de *E. coli* (Figura 11B). El hecho de no recuperar completamente la toxicidad en esta variante, sugiere que el resto de sustituciones identificadas en la toxina PasT_{ST} de *S. Typhimurium*, podrían también contribuir a la pérdida de función en esta toxina.

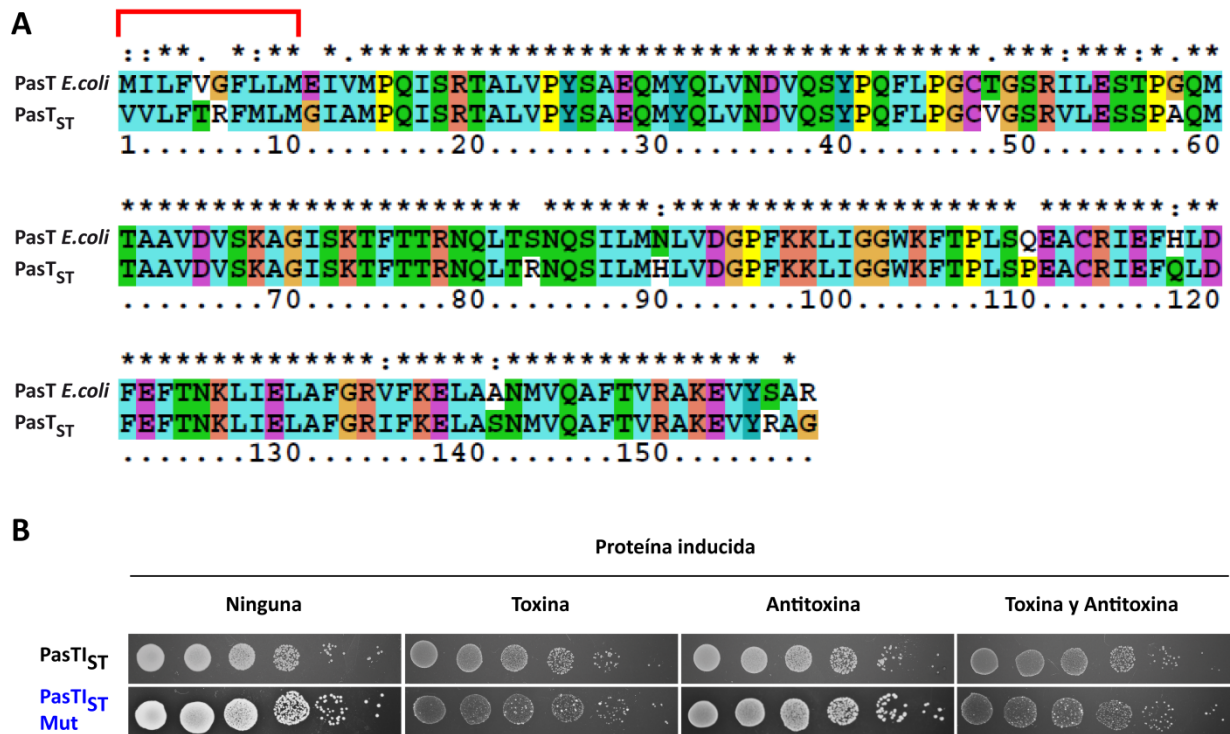


Figura 11. La ausencia de toxicidad en PasT_{ST} de *S. Typhimurium* se debe en parte, a cambios en la secuencia de aminoácidos en su región N-terminal. **A)** Alineamiento de secuencia entre las proteínas PasT de *E. coli* (parte superior) y PasT_{ST} de *S. Typhimurium* SL1344 (parte inferior). Se marcan con un corchete rojo los diez primeros aminoácidos imprescindibles para la actividad como toxina de PasT en *E. coli*. Los asteriscos indican identidad de aminoácidos. **B)** Ensayo de toxicidad y neutralización con las variantes silvestre (arriba) y mutada (abajo) de PasT_{ST}. El cambio de cinco aminoácidos en el dominio N-terminal de la proteína de *S. Typhimurium*, permite una recuperación parcial de actividad en PasT_{ST}.

Toxina IbsB_{ST}

Las toxinas Ibs, al igual que ocurre con la mayoría de las toxinas de los sistemas TA tipo I son pequeños péptidos ricos en aminoácidos hidrofóbicos, principalmente isoleucina, valina y leucina. Estas toxinas se insertan en la membrana interna de la bacteria formando poros que producen una reducción en la fuerza protón motriz. Este efecto induce una parada metabólica por una reducción en los niveles de ATP (Fozo y col., 2008a).

Se comparó la secuencia de aminoácidos de la toxina IbsB_{ST} con la de IbsA_{ST} de *S. Typhimurium*, y las toxinas IbsA_{EC} e IbsB_{EC} de *E. coli* (Figura 12). Mientras que IbsA_{ST} conserva un 75% de identidad con las toxinas Ibs de *E. coli*, IbsB_{ST} ha perdido la región central hidrofóbica, imprescindible para la interacción con la membrana y su actividad como toxina (Mok y col., 2010). Esta diferencia de secuencia podría explicar la ausencia de toxicidad observada.

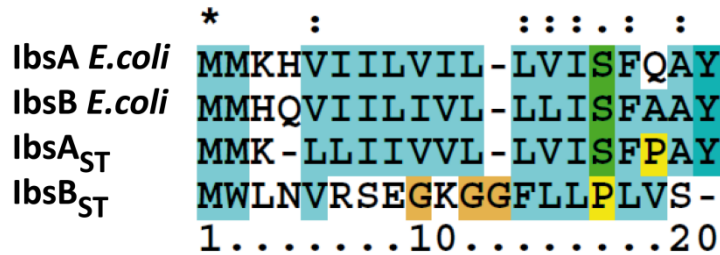


Figura 12. La toxina lbsB_{ST} de *S. Typhimurium* SL1344 no conserva la estructura típica de los sistemas lbs. Se muestra un alineamiento de la secuencia de la toxina lbsB_{ST} con el péptido lbsA_{ST} de *S. Typhimurium* y las toxinas lbsA e lbsB de *E. coli*. La toxina lbsB_{ST} ha perdido la región hidrofóbica central indispensable para su toxicidad. Los asteriscos indican identidad de aminoácidos.

Toxina HigB_{ST}

Se comparó la secuencia de aminoácidos de la toxina no funcional HigB_{ST} (Figura 8A) con la toxina HigB descrita en *E. coli* (Christensen-Dalsgaard y col., 2010). El alineamiento, mostrado en la Figura 13, demostró una escasa conservación de secuencia, con tan sólo un 13% de identidad. Esto podría indicar que aunque la base de datos TADB identificó a HigB_{ST} en base a cierta similitud con la toxina HigB de *E. coli*, ambas proteínas podrían no ser homólogas.

Toxina SymE_{ST}

El alineamiento de secuencia entre la toxina no funcional de *S. Typhimurium* SymE_{ST} (Figura 8A) y la toxina SymE de *E. coli* demuestra una alta conservación de secuencia entre ambas proteínas con un 77% de identidad (Figura 14). De interés, la toxina de *S. Typhimurium* presenta una extensión de tres aminoácidos en el extremo C-terminal y un total de 22 cambios de aminoácidos de un total de 113. No se encontró ningún dato en la literatura que permitiese correlacionar ninguno de estos cambios de aminoácido con la ausencia de toxicidad detectada en esta proteína.

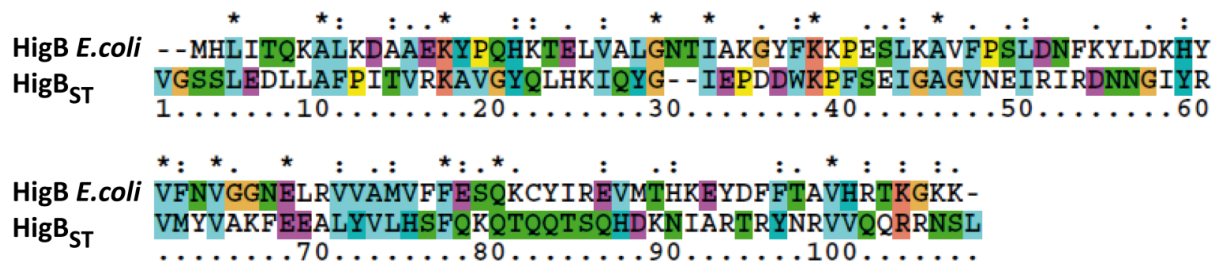


Figura 13. Alineamiento de secuencia entre las proteínas HigB de *E. coli* (parte superior) y HigB_{ST} de *S. Typhimurium* SL1344 (parte inferior). La toxina HigB_{ST} de *S. Typhimurium* presenta una secuencia poco conservada con su ortólogo de *E. coli*. Los asteriscos indican identidad de aminoácidos.

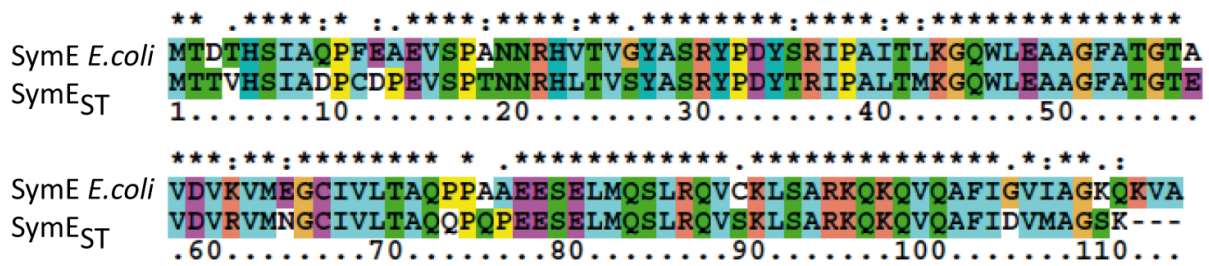


Figura 14. Alineamiento de secuencia de la toxina SymE de *E. coli* (parte superior) y SymE_{ST} de *S. Typhimurium* SL1344 (parte inferior). Los asteriscos indican identidad de aminoácidos.

Toxina T3_{ST}

La aplicación TADB no detectó homología de secuencia entre el sistema TA tipo II *ta3_{ST}* y otros sistemas TA conocidos. Este hecho impidió un estudio más detallado de esta proteína para determinar posibles causas de su pérdida de actividad.

Antitoxina A1_{ST}

Al igual que con la toxina T3_{ST}, la aplicación TADB no detectó homología de secuencia entre el sistema TA tipo II *ta1_{ST}* y otros sistemas TA conocidos. Este hecho impidió un estudio más detallado de esta proteína para determinar posibles causas de su pérdida de actividad.

Antitoxina RelB3_{ST}

Durante la búsqueda de los sistemas TA en *S. Typhimurium* aparecieron dos anotaciones independientes en la base de datos TADB para la toxina *relE3_{ST}* perteneciente al sistema TA tipo II *relBE3_{ST}*. Una de estas corresponde a una proteína codificada por los genes SL3743 y STM3777 en las estirpes SL1344 y LT2, respectivamente (Tabla 4). La segunda anotación correspondiente a una proteína codificada por el gen SeD_A4173 de *Salmonella* Dublin. Al comparar la secuencia de ambas proteínas se observó que la variante de *S. Dublin* tenía una extensión de 15 aminoácidos en su región N-terminal. El resto de la secuencia a excepción de una sustitución en el aminoácido 94 (R94S), es 100% idéntica a la versión de las estirpes SL1344 y LT2 de *S. Typhimurium* (Figura 15). Aunque en el gen SL3743 de *S. Typhimurium* SL1344 no estaba anotada la extensión N-terminal de estos 15 aminoácidos, la secuencia está presente. Esto nos hizo pensar que quizás, esta extensión podría ser necesaria para la neutralización de la toxina RelE3_{ST} por la antitoxina no funcional RelB3_{ST}, y que podría existir un error de anotación en *S. Typhimurium* SL1344. Se clonó esta nueva variante de la toxina *relE3_{ST}* y se valoró en los ensayos de toxicidad y neutralización. La nueva toxina RelE3_{ST} mutante presentó la misma toxicidad que la proteína RelE3_{ST} original. Sin embargo, la antitoxina RelB3_{ST} no neutralizó esta nueva variante. Este resultado indicó que la extensión N-terminal de 15

RESULTADOS

aminoácidos presente en *S. Dublin* no es necesaria para la neutralización de RelB3_{ST}, con lo que no se pudo concluir cuál fue la causa de la ausencia de actividad neutralizante observada en RelB3_{ST}.

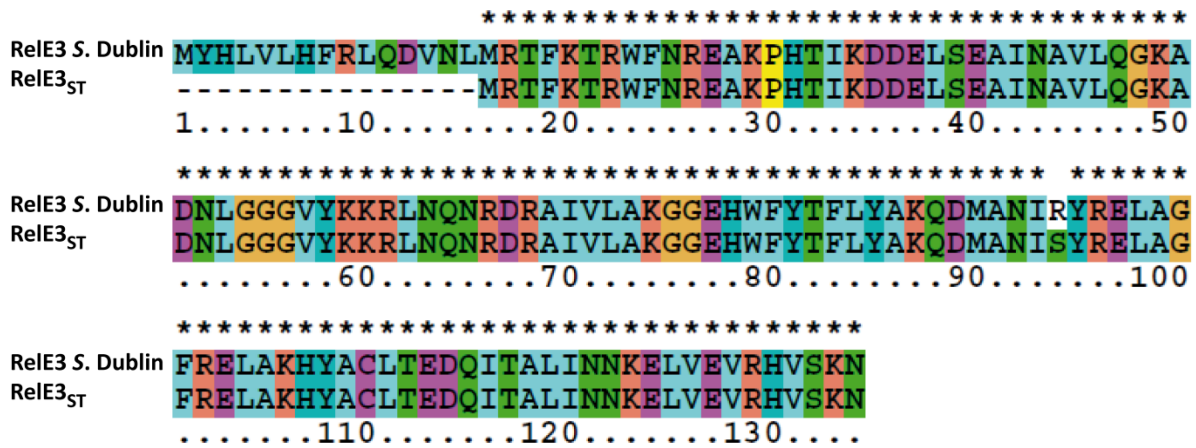


Figura 15. Alineamiento de secuencia entre las proteínas RelE3 de *S. Dublin* (parte superior) y *S. Typhimurium* SL1344 (parte inferior). Los asteriscos indican los aminoácidos conservados en cada posición.

La ausencia de función de algunos sistemas no se debe a una ausencia de expresión.

Aunque en algunas proteínas como CcdB_{ST}, PasT_{ST} o IbsB_{ST}, la ausencia de toxicidad se debió a mutaciones puntuales, desconocíamos los motivos para el resto de casos. La expresión de todas las proteínas no funcionales confirmó que la ausencia de toxicidad (toxinas HigB_{ST}, SymE_{ST}, T3_{ST} y VapC_{ST}) o de neutralización (antitoxinas A1_{ST} y RelB3_{ST}) no se debía a un defecto de transcripción/traducción de los genes clonados. En estas determinaciones los cultivos de *S. Typhimurium* conteniendo los plásmidos codificantes de las toxinas no funcionales se crecieron hasta fase exponencial, induciendo la expresión del gen clonado con IPTG o arabinosa (Anexo I). Posteriormente se obtuvieron lisados totales y se analizaron las proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. Además de las potenciales toxinas, se llevó como control una proteína fluorescente clonada en el mismo vector. De esta forma, diferenciábamos si la ausencia de proteína podría deberse a una falta de síntesis de la proteína en cuestión o a un problema resolutivo intrínseco a la técnica empleada. Por este método únicamente se pudo detectar claramente la proteína VapC_{ST} (Figuras 16A). Debe tenerse en cuenta que la proteína control empleada tampoco se observó en la tinción por Coomassie, a pesar de que ensayos de microscopía de epifluorescencia mostraron expresión de dicha proteína (Figura 17). Para confirmar la expresión de las proteínas no detectadas en los geles de poliacrilamida, se volvieron a clonar los genes codificantes de estas proteínas no funcionales en vectores de expresión que contenían epítomos 6xHis (toxina symE_{ST}) o HA (antitoxinas a1_{ST} y relB3_{ST}, y toxinas higB_{ST} y t3_{ST}). Se confirmó por inmunodetección con anticuerpos la expresión de todas las proteínas no funcionales

(Figura 16C). Destacar que los niveles relativos de HigB_{ST} no fueron demasiado elevados y que en el caso de la toxina T3_{ST} se observaron proteínas producto de degradación. Estas limitaciones no parecen lo suficientemente significativas como para explicar la falta de actividad de estas proteínas en el ensayo de viabilidad.

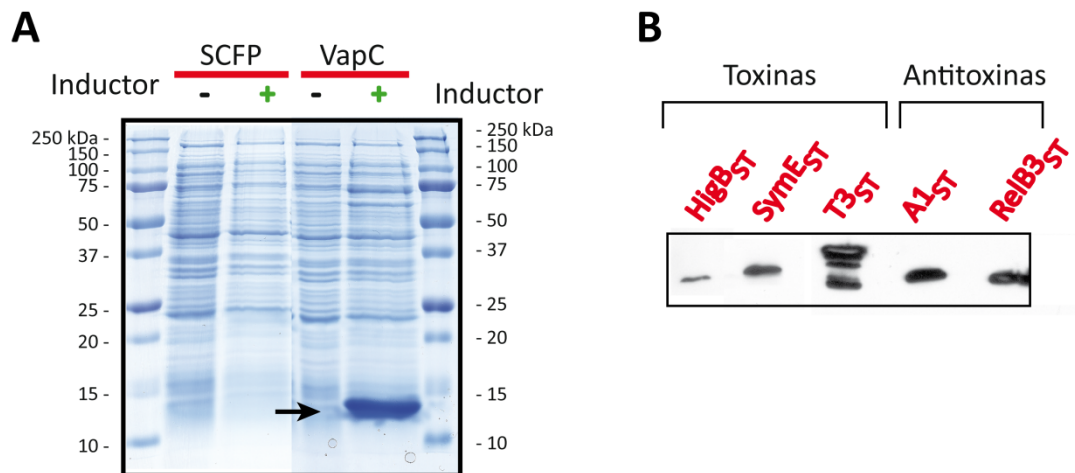


Figura 16. La ausencia de actividad tóxica o neutralizante de toxinas y antitoxinas no se debe a una ausencia de expresión de las proteínas. A) Geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS en los que se procesaron las muestras de la inducción de las proteínas no funcionales. La flecha indica la proteína VapC_{ST}. Se cargaron 0,2 unidades de absorbancia totales, procedentes de cultivos crecidos hasta fase exponencial (DO₆₀₀ de 0,3) e inducidos 3 h con 0.4% arabinosa. Mm SCFP, 26,9 KDa, Mm VapC_{ST}, 14,9 KDa. **B)** Ensayos de western blot para las antitoxinas y toxinas no funcionales fusionadas a epítomos 6xHis o HA.

La expresión de algunas toxinas no funcionales de posibles sistemas TA altera la morfología de *S. Typhimurium*.

Dado que los ensayos de toxicidad y neutralización en *E. coli* fueron negativos, que se detecto la expresión de todas las proteínas no funcionales, y que sólo en algunos casos se identificaron residuos relacionados con función, se comprobó si la expresión de las toxinas no funcionales podría causar alteraciones morfológicas. Las imágenes de microscopía mostrados en la Figura 17, demostraron que la expresión ectópica de las proteínas HigB_{ST}, T3_{ST} y VapC_{ST} dio lugar a la formación de cuerpos de inclusión localizados en los extremos de la célula (polares). En los casos de IbsB_{ST} y VapC_{ST} se vieron alteraciones severas de la estructura bacilar típica de *S. Typhimurium*, apareciendo bacterias de menor tamaño y superficie irregular. En el caso de VapC_{ST}, la alteración morfológica podría asociarse a la expresión elevada de la proteína (Figura 16A) y la formación de cuerpos de inclusión polares, y no a un efecto tóxico propio de VapC_{ST}. La expresión de la toxina SymE_{ST} no afectó la morfología.

Todos estos estudios permitieron concluir que: **i)** los vectores de expresión diseñados mostraron una correcta respuesta al inductor y una represión eficaz en ausencia de inductor; **ii)** el ensayo de

RESULTADOS

siembra en gota elegido para el análisis de funcionalidad de las toxinas y antitoxinas, demostró ser sensible y específico para detectar sistemas TA funcionales, así como falsos positivos; **iii)** *S. Typhimurium* SL1344 tiene, al menos, 18 sistemas TA funcionales de los 27 posibles inicialmente identificados.

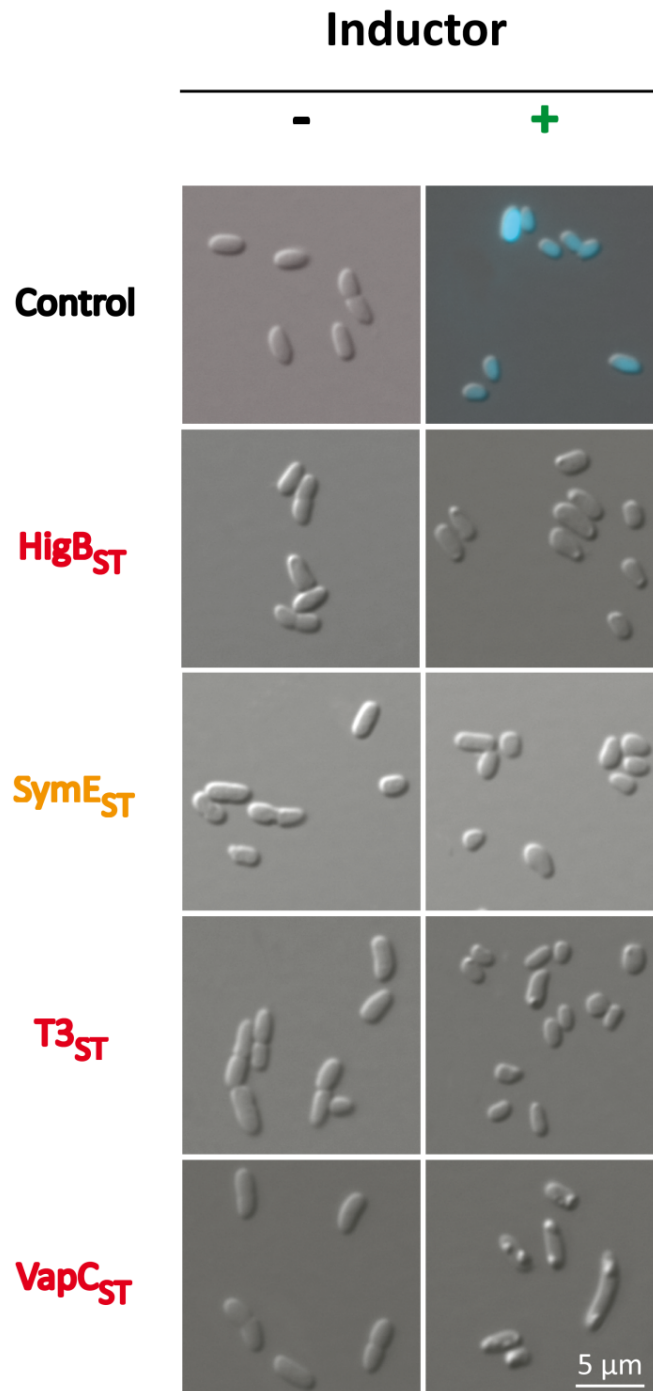


Figura 17. Cambios en la morfología de *S. Typhimurium* causados por la expresión de toxinas no funcionales. Se emplearon los mismos cultivos que los usados para las pruebas de expresión e inmunodetección (Figura 16). Se usó como control el vector en el que se había clonado la proteína fluorescente *scfp*. -, cultivo sin inducir; +, cultivo inducido durante 3h con 0.4% arabinosa (HigB_{ST}, T3_{ST} y VapC_{ST}) o 2mM IPTG (SymE_{ST}).

***S. Typhimurium* posee un repertorio de sistemas TA más amplio que la especie no patógena emparentada *S. bongori*.**

Los sistemas TA son módulos de respuesta a estrés. Además, la vacuola en la que reside *S. Typhimurium* en el interior de la célula eucariota es un ambiente hostil con escasez de nutrientes, baja presión de oxígeno, péptidos antimicrobianos o estrés oxidativo. El elevado número de sistemas TA funcionales demostrado en el genoma de *S. Typhimurium* podría ser reflejo de la adaptación de este patógeno al nicho intracelular. Para confirmar si la adquisición de sistemas TA podría contribuir a la virulencia en serovares de la subespecie I (*enterica*) de *S. enterica*, se comparó su distribución en *S. Typhimurium* con otros serovares patógenos de la subespecie I de *S. enterica*. También se incluyeron en este estudio dos cepas de la especie no patógena *S. bongori* con genomas secuenciados. Los serovares de la subespecie I se distribuyeron en dos grupos atendiendo al tipo de enfermedad que provocan: enfermedades intestinales o extraintestinales. La distribución de los genes codificantes de toxinas y antitoxinas se basó en un reciente estudio genómico comparativo entre diversos serovares de *S. enterica* (Nuccio y Bäumlér, 2014). Los resultados de esta comparativa demostraron que *S. Typhimurium* SL1344 posee mayor número de sistemas TA que *S. bongori* (Figura 18). En total, las dos estirpes de *S. bongori* comparten únicamente 8 de los 27 sistemas de *S. Typhimurium* SL1344, descartando aquellos sistemas TA en los que aparece sólo la toxina o sólo la antitoxina. Además, si se descartan aquellos sistemas TA que catalogamos como no funcionales (*symER_{ST}*, *ta1_{ST}*, *ta3_{ST}*, *pasTl_{ST}* y *vapBC_{ST}*), la diferencia es aún mayor, ya que según la estirpe de *S. bongori* consultada aparecerían solamente 3-4 módulos TA de los 18 que posee *S. Typhimurium* SL1344 (Figura 18). Este resultado se ajusta al de otros trabajos previos en los que se describe que especies patógenas poseen, en general, una mayor número de módulos TA que especies no patógenas filogenéticamente emparentadas (Ramage y col., 2009, Georgiades y Raoult, 2011, De la Cruz y col., 2013, Sala y col., 2014).

En el resto de serovares patógenos empleados en el análisis se identificaron la mayoría de módulos TA descritos en *S. Typhimurium*. Algunas excepciones fueron *hok-sok_{ST}*, *ibsA-sibA_{ST}*, *ccdAB_{ST}*, *parDE_{ST}*, *relBE_{ST}*, *relBE4_{ST}* y *vapBC2_{ST}*, que aparecen restringidos al serovar *Typhimurium*. En este serovar, *hok-sok_{ST}*, *ccdAB_{ST}*, *relBE4_{ST}* y *vapBC2_{ST}* están localizados en los plásmidos pSLT y pCol1B9 que no tienen el resto de serovares, lo que explicaría la distribución tan restringida de estos sistemas TA (Figura 18).

Algunos sistemas TA como *tisB-istR_{ST}*, *ta2_{ST}* o *ta4_{ST}*, están conservados en todas las estirpes analizadas, hecho que sugiere que se adquirieron en un momento temprano de la evolución, antes de que el género *Salmonella* se dividiera en dos especies.

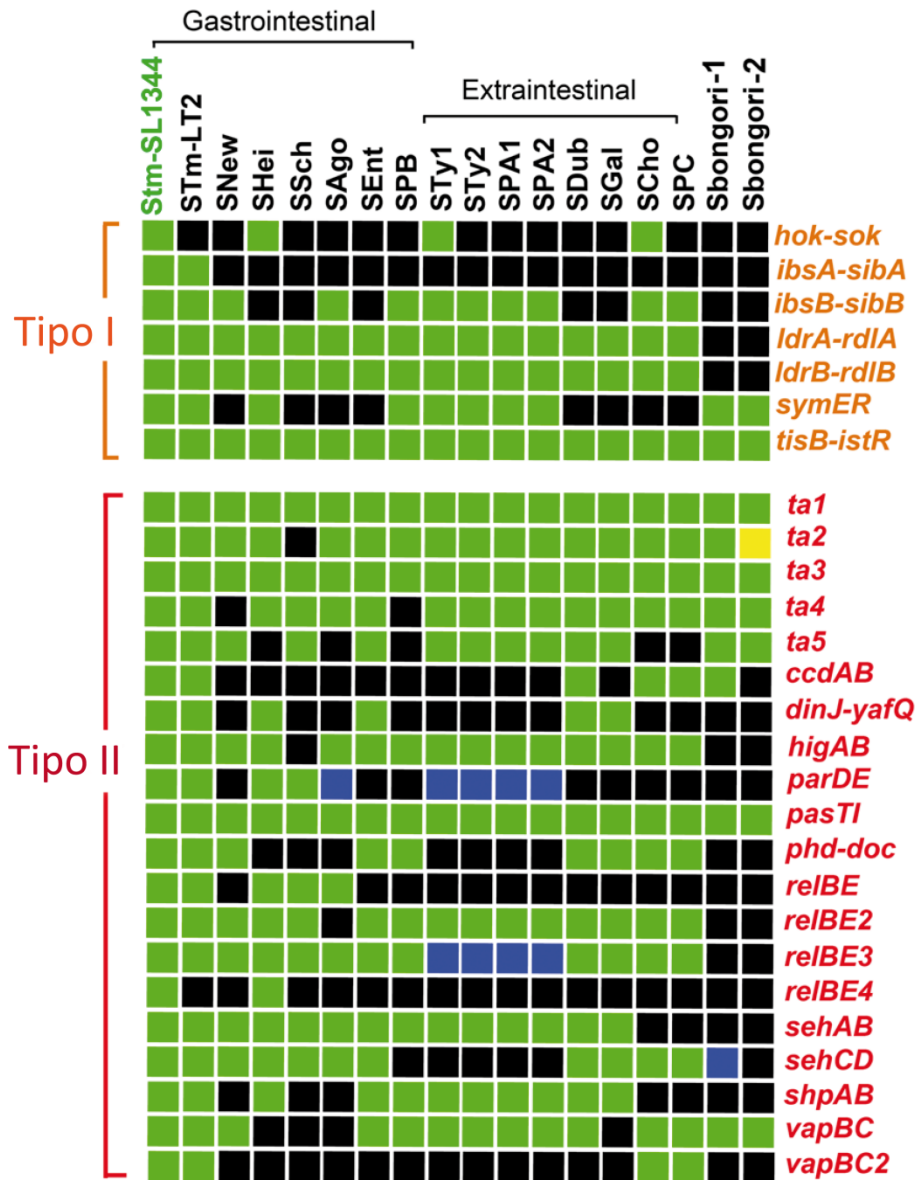


Figura 18. *S. Typhimurium* SL1344 posee un mayor número de módulos TA que la especie no patógena *S. bongori*. La búsqueda de ortólogos de toxinas y antitoxinas se llevó a cabo complementando la base de datos descrita por Nuccio y Bäumlér (Nuccio y Bäumlér, 2014) con búsquedas tipo TBLASTN. Los serovares de *S. enterica* se dividieron en dos grupo atendiendo al tipo de enfermedad que producen: limitada al intestino (gastrointestinal) o sistémica (extraintestinal). Abreviaturas: STm-SL1344, *S. Typhimurium* SL1344; STm-LT2, *S. Typhimurium* LT2; SNew, *S. Newport* SL254; SHei, *S. Heildeberg* SL476; SSch, *S. Schwarzengrund* CVM19633; SAgo, *S. Agona* SL483; SEnt, *S. Enteritidis* P125109; SPB, *S. Paratyphi B* SP87; STy1; *S. Typhi* CT18; STy2; *S. Typhi* Ty2; SPA1, *S. Paratyphi A* ATCC9150; SPA2, *S. Paratyphi A* AKU_12601; SDub, *S. Dublin* CT_02021853; SGal, *S. Gallinarum* 287/91; SCho, *S. Choleraesuis* SC-B67; SPC, *S. Paratyphi C* RKS4594; *S. bongori*-1, cepa N268-08; *S. bongori*-2, cepa NCTC12419. Código de colores: verde, detectadas toxina y antitoxina; azul, detectada sólo toxina; amarillo, detectada sólo antitoxina; negro, no detectadas ni toxina ni antitoxina. Se marcan con color naranja y rojo los sistemas TA tipo I y II, respectivamente. Sólo se consideraron positivos aquellos candidatos con valores-e iguales o inferiores a 10^{-5} con una secuencia alineada de al menos 30 aminoácidos (salvo en el caso de los sistemas TA tipo I, cuyas toxinas presentan menos de 30 aminoácidos).

Inducción selectiva en S. Typhimurium de determinados sistemas TA en el interior de células eucariotas.

Diversos estudios han demostrado que los sistemas TA pueden servir como módulos de respuesta ante distintas situaciones de estrés (Christensen y col., 2001, Buts y col., 2005, Aguirre-Ramírez y col., 2006, Nariya y Inouye, 2008, Christensen-Dalsgaard y col., 2010, Wang y Wood, 2011), contribuyendo así a la supervivencia del patógeno en el hospedador (Ren y col., 2012, Norton y Mulvey, 2012, Ren y col., 2014). Estos estudios se centran en un sistema TA o subconjunto de ellos y no analizan a nivel celular la contribución de los módulos TA. Esta falta de información nos hizo preguntarnos si los sistemas TA de *S. Typhimurium* podrían también participar en la supervivencia intracelular de la bacteria. En las secciones anteriores se ha descrito que *S. Typhimurium* SL1344 tiene 18 módulos funcionales. Focalizar en un número reducido de sistemas podría hacer que perdiésemos información relevante. Para analizar de forma global todos los sistemas TA de *S. Typhimurium* SL1344 que podrían contribuir a la supervivencia intracelular, se llevaron a cabo estudios de proteómica por espectrometría de masas (sistemas TA tipo I y II) y PCR cuantitativa en tiempo real (sistemas TA tipo I). Se compararon muestras de bacterias crecidas en medio LB (extracelular) con bacterias extraídas del interior de células eucariotas infectadas (intracelular). Esta aproximación permitiría detectar aquellos posibles módulos TA que pudiesen estar induciéndose durante la vida intracelular de *S. Typhimurium*. Como modelo celular empleamos la línea de fibroblastos humanos BJ-5ta, en la que *S. Typhimurium* prolifera con tasas muy inferior a las descritas en células epiteliales o macrófagos (Martínez-Moya y col., 1998, Tierrez y García-del Portillo, 2005, Malik-Kale y col., 2012).

S. Typhimurium expresa sistemas TA tipo II en el interior de fibroblastos.

Para la detección de sistemas TA se infectaron fibroblastos humanos BJ-5ta durante 24 h con *S. Typhimurium* SL1344. Tanto las muestras de bacteria crecida *in vitro* (extracelular) como la bacteria obtenida de fibroblastos infectados (intracelular) se lisaron y analizaron por espectrometría de masas. A pesar del pequeño tamaño de las toxinas y antitoxinas (promedio 100 aminoácidos para los sistemas TA tipo II), estos análisis detectaron al menos un componente (toxina y/o antitoxina) de un total de siete sistemas TA tipo II (Tabla 5). Estos sistemas TA correspondían a los que codifican las toxinas funcionales T2_{ST}, T4_{ST}, T5_{ST}, RelE_{ST}, Doc_{ST} y VapC2_{ST}, y las antitoxinas funcionales A2_{ST}, A5_{ST}, ParD_{ST} y VapB2_{ST} (Tabla 5). No se detectó ninguna proteína perteneciente a un sistema TA funcional exclusivamente en el ambiente intracelular, es decir, sin presencia en bacteria crecida extracelularmente en medio LB. A pesar del carácter semi-cuantitativo del tipo de análisis proteómico realizado, algunas proteínas como VapC2_{ST} se detectaron con mejores parámetros en la

RESULTADOS

bacteria intracelular. Para confirmar estas identificaciones se etiquetaron cuatro toxinas de sistemas TA tipo II con el epítipo 3xFLAG, valorando sus niveles relativos por inmunodetección con anticuerpos. En base a dos características propias de los sistemas TA se decidió etiquetar únicamente las toxinas. Primero, la técnica de etiquetado empleada introduce el epítipo 3xFLAG en el extremo C-terminal. En la mayoría de los sistemas TA el gen que codifica la antitoxina precede y solapa con el que codifica la toxina, con lo que el etiquetado de la antitoxina habría producido un efecto polar en la transcripción del operón TA. Segundo, la activación transcripcional de los sistemas TA se asocia a un aumento en los niveles de la toxina como resultado de una degradación preferencial de la antitoxina (Christensen y col., 2001).

Tabla 5. Toxinas y antitoxinas de sistemas TA de *S. Typhimurium* TA detectadas por espectrometría de masas.

Código acceso	Proteína*	Mm (Da)	Extracelular (†)			Intracelular (‡)		
			Péptidos únicos	PSMs	Cobertura** (%)	Péptidos únicos	PSMs	Cobertura** (%)
SL1479	RelE _{ST}	11.070	3	8	29,79	1	4	9,57
SL1480	RelB _{ST}	9.086	1	2	23,17	-	-	-
SL2379	A1 _{ST}	13.536	4	19	33,33	-	-	-
SL2380	T1 _{ST}	14.966	4	6	34,62	-	-	-
SL2658	PasI _{ST}	10.769	3	6	31,25	-	-	-
SL2659	PasT _{ST}	17.725	2	3	13,29	-	-	-
SL2884	A2 _{ST}	10.673	2	5	28,13	2	2	31,25
SL2885	T2 _{ST}	19.059	2	4	13,14	2	4	20,00
SL2936	ParD _{ST}	10.369	-	-	-	1	1	7,69
SL3011	VapC _{ST}	14.930	-	-	-	1	1	21,21
SL3012	VapB _{ST}	14.276	2	3	13,60	1	2	6,40
SL3437	T3 _{ST}	22.767	11	27	68,00	8	27	47,00
SL3484	DinJ _{ST}	9.442	2	4	24,42	-	-	-
SL3524	Doc _{ST}	13.580	1	2	7,38	1	2	10,66
SL3617	T4 _{ST}	17.693	2	5	22,36	1	3	8,07
SL3744	RelB3 _{ST}	11.754	4	6	36,45	-	-	-
SL3976	SehB _{ST}	15.915	1	2	7,75	-	-	-
SL3979	SehC _{ST}	12.326	1	1	8,33	-	-	-
SL4253	A5 _{ST}	10.972	1	2	9,28	2	4	23,71
SL4254	T5 _{ST}	17.636	1	1	7,98	1	6	7,98
SL4460	ShpB _{ST}	11.368	2	3	39,00	-	-	-

Código acceso	Proteína*	Mm (Da)	Extracelular (†)			Intracelular (‡)		
			Péptidos únicos	PSMs	Cobertura** (%)	Péptidos únicos	PSMs	Cobertura** (%)
SL4459	<u>ShpA_{ST}</u>	11.289	2	2	22,11	-	-	-
SLP2_0003	RelB4	10.176	1	1	7,87	-	-	-
SLP2_0004	<u>RelE4_{ST}</u>	10.888	1	4	15,05	-	-	-
PSLT028	CcdB _{ST}	11.581	3	13	40,59	3	8	40,59
PSLT107	VapB2 _{ST}	8.636	1	2	10,53	2	3	22,37
PSLT106	<u>VapC2_{ST}</u>	14.879	2	6	21,21	3	7	29,55

(*) Las proteínas correspondientes a toxinas aparecen subrayadas.

(**) La cobertura indica el porcentaje del total de aminoácidos detectados en una proteína atendiendo a la longitud de los péptidos identificados.

(†) Extractos de proteínas preparados a partir de bacteria crecida en medio LB a 37°C sin agitación hasta alcanzar fase estacionaria (16 h). Se realizaron dos experimentos independientes. PSM (*peptide spectrum match*), número de identificaciones para un péptido concreto.

(‡) Extractos de proteínas preparados a partir de bacteria extraída de fibroblastos BJ-5ta infectados durante 24 h. Se realizaron tres experimentos independientes. PSM (*peptide spectrum match*), número de identificaciones para un péptido concreto.

Los ensayos de western blot confirmaron la expresión de las cuatro toxinas etiquetadas en la bacteria extracelular (Figura 19A). Los niveles relativos de cada una de ellas fue marcadamente distinto (Figura 19A). Estos resultados indican que los cultivos en fase estacionaria, en los que se han consumido los nutrientes disponibles y el medio se ha acidificado, podrían ser condicionantes suficientes para la inducción de ciertos sistemas TA.

Cuando se infectaron fibroblastos humanos BJ-5ta con las cuatro estirpes etiquetadas en las toxinas T2_{ST}, T4_{ST}, T5_{ST} o VapC2_{ST}, se detectó un incremento de los niveles relativos de todas ellas (entre 4-13 veces) en la bacteria intracelular (Figura 19B). VapC2_{ST} fue la toxina que mostró la mayor inducción, lo cual concuerda con la buena detección de esta proteína en los ensayos de proteómica en bacteria intracelular (Tabla 5).

En su conjunto, estos datos demuestran por primera vez la capacidad de *S. Typhimurium* de sintetizar varias toxinas en distinta proporción, cuando se encuentra en un medio de cultivo LB en el que se han agotado los nutrientes. También demuestran que la bacteria es capaz de inducir determinadas toxinas en el interior de células eucariotas infectadas.

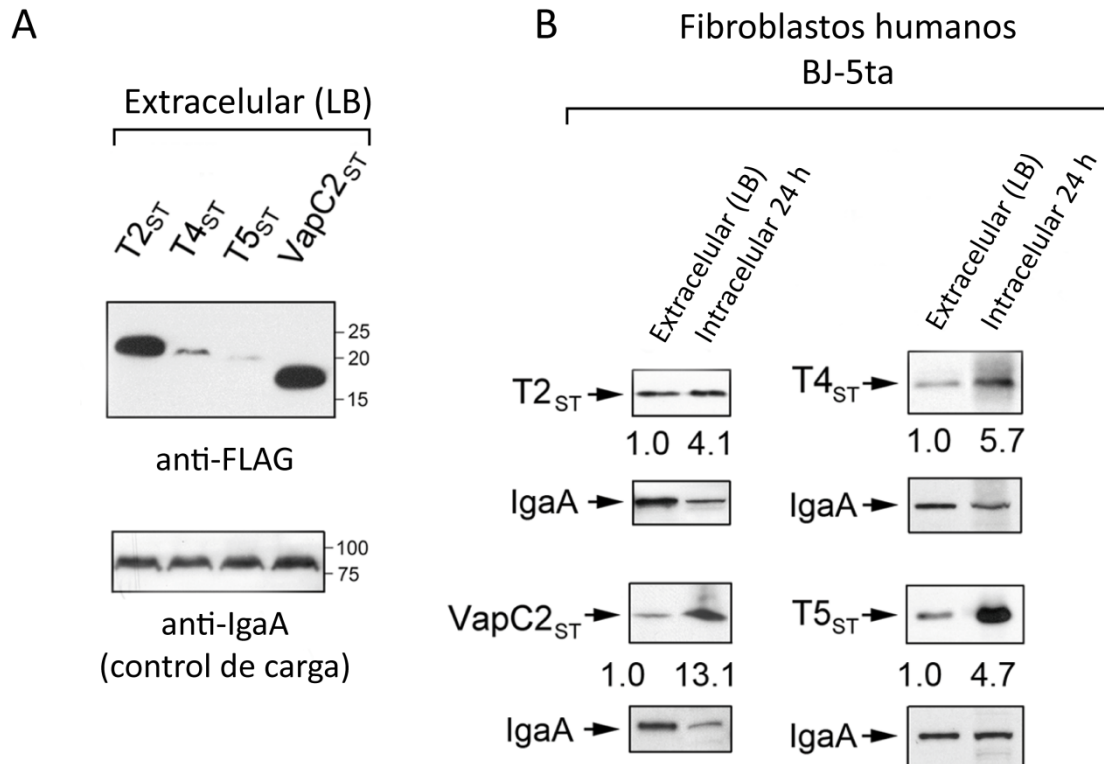


Figura 19. *S. Typhimurium* induce la expresión de algunas toxinas de sistemas TA tipo II en el interior de fibroblastos. Se etiquetaron varias toxinas de sistemas TA tipo II detectadas en el ensayo de proteómica con un epítipo 3xFLAG (Tabla 5). A partir de bacteria extracelular crecida hasta fase estacionaria, se infectaron fibroblastos humanos BJ-5ta durante 24 h, momento en el que se lisaron y se extrajo la bacteria intracelular. Los extractos de proteínas de bacterias crecidas en LB o en el interior de fibroblastos se emplearon para western blot. **A)** Muestras de bacteria extracelular. Destacar los distintos niveles relativos de cada toxina. **B)** Análisis comparativo de los niveles de toxinas en bacteria extracelular e intracelular. Las cuatro toxinas analizadas se inducen en bacteria intracelular. Se usó la proteína de membrana IgaA como control de carga. Los números situados bajo las bandas de las toxinas corresponden a los valores de densitometría normalizados al de bacteria extracelular y ajustados por los niveles de IgaA en las dos muestras.

S. Typhimurium induce la expresión de tres toxinas de sistemas TA tipo I en el interior de fibroblastos.

Los ensayos de proteómica basados en espectrometría de masas de alta resolución no detectaron ninguna toxina de sistemas TA tipo I en bacteria extracelular o intracelular. Estas toxinas son péptidos de pequeño tamaño (19-29 aminoácidos) que, tras ser digeridos con tripsina, podrían generar péptidos con masas inferiores al rango utilizado en la mayoría de ensayos estándar (Alix y Blanc-Potard, 2009). Para comprobar si *S. Typhimurium* induce alguna toxina de sistemas TA tipo I durante la infección de fibroblastos se analizaron por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) los niveles de ARNm de cinco toxinas de los sistemas TA tipo I que mostraron actividad: *hok_{ST}*, *ibsA_{ST}*, *ldrA_{ST}*, *ldrB_{ST}* y *tisB_{ST}*. Al comparar las muestras de bacteria extracelular e intracelular se comprobó

que los niveles de ARNm de las toxinas *hok_{ST}*, *ldrA_{ST}* y *tisB_{ST}* fueron significativamente superiores en bacteria intracelular (Figura 20).

Al igual que ocurrió con las toxinas de los sistemas TA tipo II, *S. Typhimurium* induce determinados sistemas TA tipo I en fibroblastos, línea celular en la que muestra una baja tasa de proliferación.

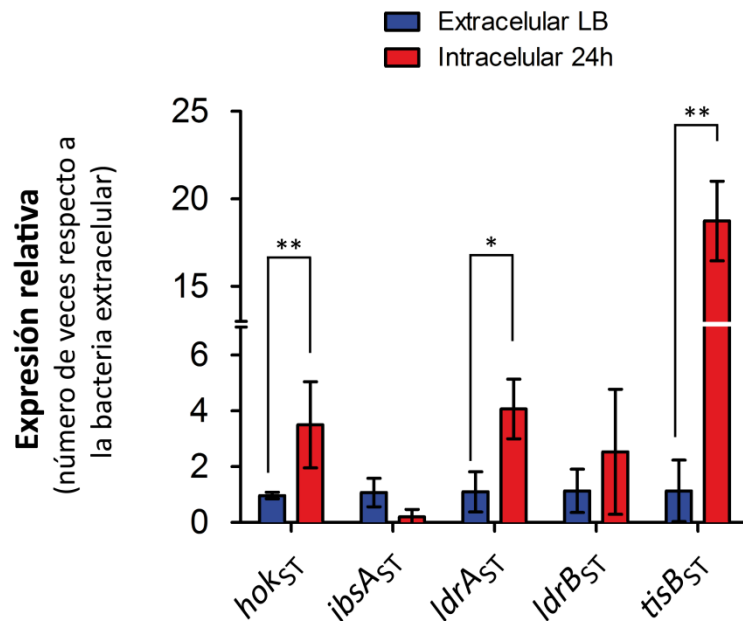


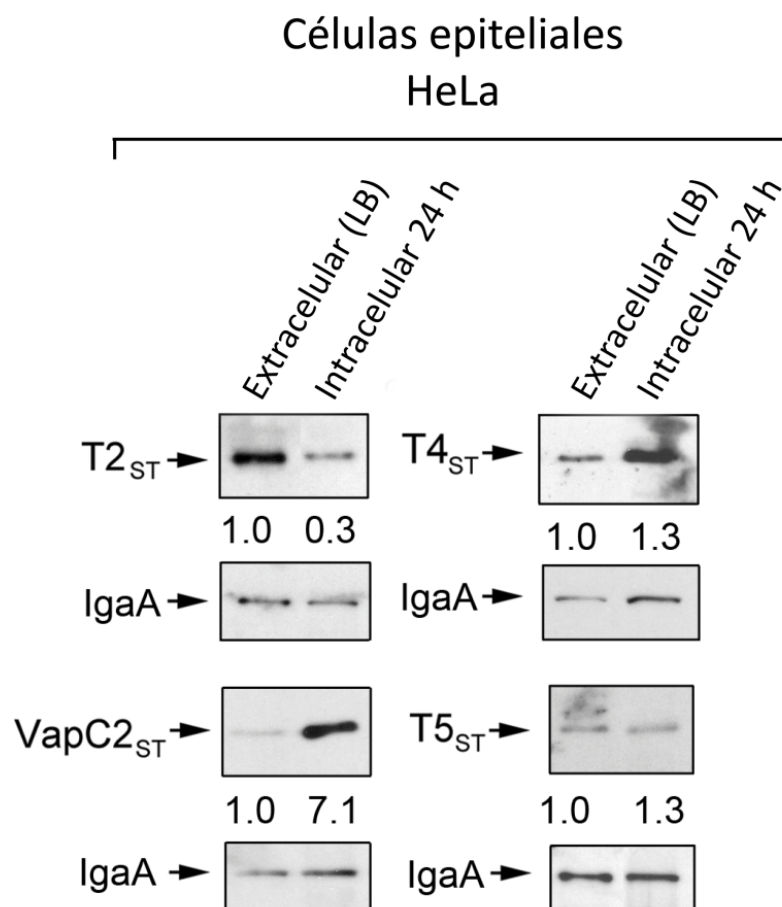
Figura 20. *S. Typhimurium* induce la expresión selectiva de toxinas pertenecientes a sistemas TA tipo I en el interior de fibroblastos. Se muestra los niveles relativos de ARNm de cinco genes codificantes de toxinas de sistemas TA tipo I. Las toxinas *hok_{ST}*, *ldrA_{ST}* y *tisB_{ST}*, se indujeron en la bacteria crecida 24 h en el interior de fibroblastos humanos BJ-5ta infectados con *S. Typhimurium* SL1344 (muestra intracelular). La obtención de bacteria intracelular se realizó como en el experimento mostrado en la Figura 19. Los datos se corresponden a la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. *, $P = 0,01$ a $0,05$; **, $P = 0,001$ a $0,01$, según análisis de t-student.

S. Typhimurium aumenta la expresión de un menor número de sistemas TA tipo II en células epiteliales.

S. Typhimurium muestra una menor tasa de proliferación en fibroblastos que en otros tipos celulares como células epiteliales (Martínez-Moya y col., 1998, Tierrez y García-del Portillo, 2005). Esta baja tasa de crecimiento puede deberse a la acción coordinada de factores celulares y de la propia bacteria. Por otro lado, los sistemas TA podrían contribuir a la respuesta a estrés mediante la inducción de un tipo de parada metabólica que permita sobrevivir a la situación adversa hasta que ésta desaparezca. Además, los resultados de western blot y RT-qPCR mostrados con anterioridad demuestran que *S. Typhimurium* SL1344 aumenta la expresión de determinadas toxinas en el interior de fibroblastos. Estas observaciones nos llevó a preguntarnos si la infección de otro tipo celular, más

RESULTADOS

permisivo para la supervivencia intracelular, podría activar o no, el mismo set de sistemas TA. Para ello, se seleccionaron las células epiteliales HeLa como modelo de infección, donde *S. Typhimurium* prolifera activamente (Malik-Kale y col., 2012). Las células epiteliales HeLa proporcionan un modelo de infección de células eucariotas para *S. Typhimurium* bien definido, en el que los mecanismos moleculares durante las distintas etapas de invasión y supervivencia intracelular han sido ampliamente estudiados (Steele-Mortimer y col., 1999, Unsworth y col., 2004, Birmingham y col., 2005, Hautefort y col., 2008). Se infectaron células HeLa según lo descrito para los fibroblastos BJ-5ta y se valoraron los niveles de las cuatro toxinas T2_{ST}, T4_{ST}, T5_{ST} y VapC2_{ST} en bacteria intracelular (Figura 21). A diferencia de lo observado en fibroblastos, la bacteria que prolifera en células epiteliales mantiene constante los niveles de las toxinas T4_{ST} y T5_{ST}, y reduce los de la toxina T2_{ST}. Sólo en el caso de VapC2_{ST}, toxina codificada en el plásmido de virulencia pSLT, se observó un comportamiento similar al de fibroblastos, con un aumento significativo de los niveles de toxina en la bacteria intracelular (Figura 21).



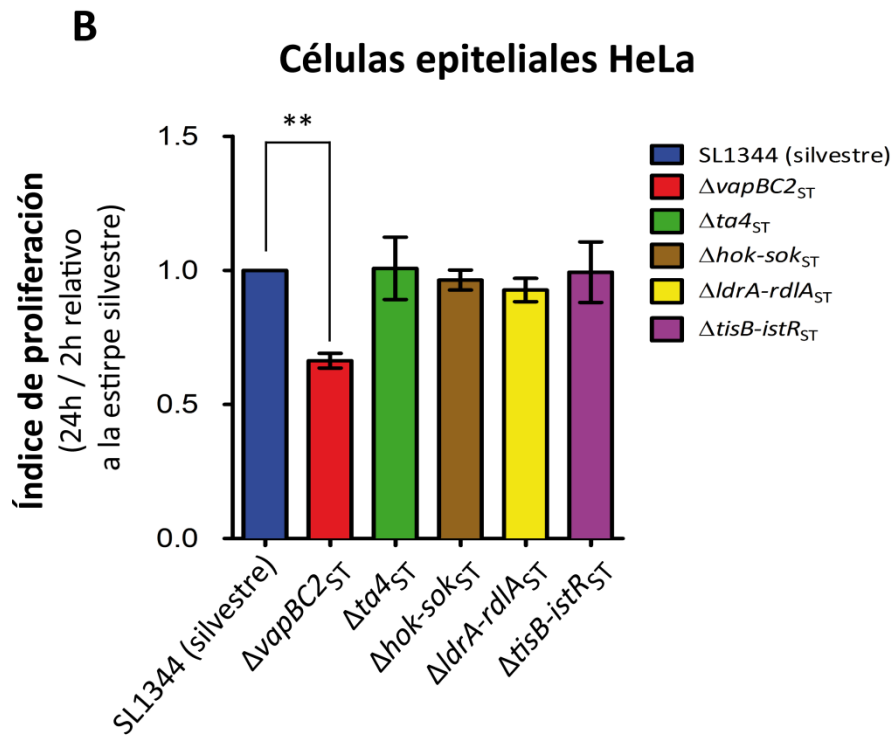
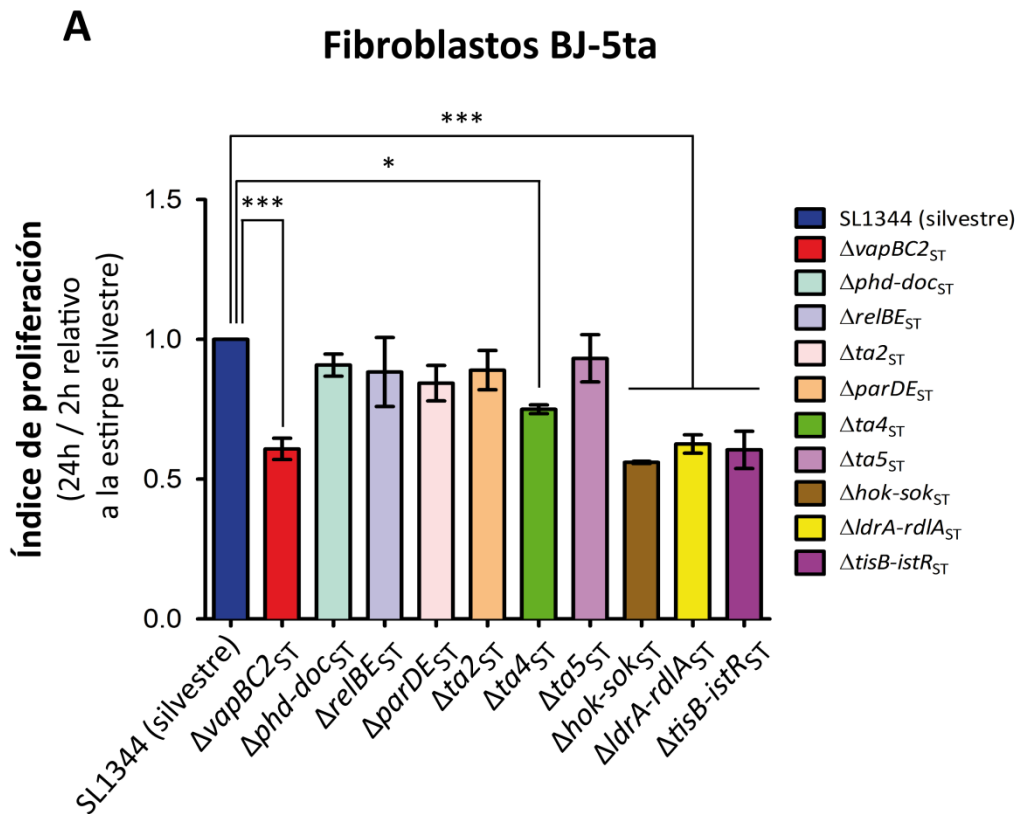
En su conjunto, estos resultados indican que *S. Typhimurium* podría inducir selectivamente determinadas toxinas de sistemas TA, en función no sólo de la infección de células eucariotas, sino también en base al tipo celular que infecta.

Contribución de sistemas TA a la supervivencia de S. Typhimurium en el interior de fibroblastos y células epiteliales.

La expresión diferencial de determinados sistemas TA en distintos tipos celulares puede reflejar una contribución de dichos sistemas a la fisiología de la bacteria intracelular. Esta hipótesis fue evaluada con mutantes isogénicos de *S. Typhimurium* SL1344 carentes de sistemas TA. Se deletionaron individualmente los sistemas TA funcionales tipo II detectados por el ensayo proteómico (*parDE*_{ST}, *phd-doc*_{ST}, *relBE*_{ST}, *ta2*_{ST}, *ta4*_{ST}, *ta5*_{ST} y *vapBC2*_{ST}), y tipo I (*hok-sok*_{ST}, *ldrA-rdIA*_{ST} y *tisB-istR*_{ST}) cuya toxina se vio significativamente incrementada en los experimentos de RT-qPCR (Tabla 5 y Figura 20). Estas estirpes mutantes se utilizaron para infectar fibroblastos humanos BJ-5ta y determinar su índice de proliferación intracelular. La pérdida de los sistemas TA *hok-sok*_{ST}, *ldrA-rdIA*_{ST}, *tisB-istR*_{ST}, *ta4*_{ST} y *vapBC2*_{ST} afectó la capacidad de supervivencia intracelular (Figura 22A). Sin embargo, cuando estos mismos mutantes se ensayaron en la línea de células epiteliales HeLa, únicamente el mutante Δ *vapBC2*_{ST} presentó una reducción en supervivencia similar al observado en fibroblastos BJ-5ta (Figura 22B).

Para descartar artefactos derivados de la inactivación de los sistemas TA, se realizaron distintos experimentos control. Primero, se confirmó que la reducción en viabilidad intracelular de los mutantes isogénicos en sistemas TA tipo II no era debido a efectos polares consecuencia de la delección. Segundo, se valoró la capacidad de invasión de todos los mutantes. Tercero, se valoró la capacidad de crecimiento de los mutantes en medio LB. Cuarto, se midieron los índices de proliferación de los mutantes en otra línea celular de fibroblastos.

Figura 21. Expresión diferencial de toxinas de sistema TA tipo II en *S. Typhimurium* que prolifera en el interior de células epiteliales HeLa. Se compararon los niveles de expresión de las toxinas etiquetadas T2_{ST}, T4_{ST}, T5_{ST} y VapC2_{ST}, en bacteria extracelular e intracelular. En este caso, únicamente la toxina VapC2_{ST} se induce durante la infección. Se usó la proteína de membrana IgaA como control de carga. Los números situados bajo las bandas de las toxinas corresponden a los valores de densitometría normalizados a los niveles de toxina en bacteria extracelular y a los niveles de control de carga en ambas muestras.



La baja supervivencia en fibroblastos mostrada por algunos mutantes de S. Typhimurium carentes de sistemas TA se debe a la eliminación del módulo TA y no al procedimiento genético de delección empleado.

Sistema *vapBC2_{ST}* del plásmido de virulencia.

El sistema TA plasmídico *vapBC2_{ST}* se detectó en una localización genómica particular (Figura 23A). Los genes *vapB2_{ST}* y *vapC2_{ST}* se encuentran en la hebra codificante del ADN y solapan completamente con el gen situado en la hebra complementaria, *trbH*. *trbH* forma parte del operón *tra*, implicado en la conjugación del plásmido de virulencia pSLT (Figura 23A).

Para confirmar que la baja tasa de supervivencia intracelular mostrada por el mutante de delección *vapBC2_{ST}::km^R* (Figura 23B) no se debía a la inactivación de *trbH* o efectos polares en el operón *tra*, se construyeron dos mutantes adicionales (Figura 23B). En uno de ellos se “limpió” el módulo de resistencia *aph-parE* con el que se había inactivado *vapBC2* (Figura 23B). En el segundo, se insertó un módulo de resistencia a kanamicina detrás de *vapC2_{ST}*, manteniendo intacto el operón TA, pero interrumpiendo *trbH* (Figura 23B). Ambas cepas mutantes demostraron que la reducción en la supervivencia intracelular se debía a la pérdida del operón *vapBC2_{ST}* y no a la interrupción de *trbH* ó a efectos polares en los genes de conjugación. Los mutantes *vapBC2::Km* y Δ *vapBC2_{ST}* mostraron una baja tasa de supervivencia intracelular, fenotipo no observado en el mutante *vapBC2_{ST}-trbH::Km*, que mostró una proliferación idéntica a la estirpe de *S. Typhimurium* SL1344 silvestre (Figura 23C).

Sistema *ta4_{ST}* cromosómico.

Al igual que en el caso de *vapBC2_{ST}*, se construyó un mutante en el que se eliminó el módulo de resistencia a antibiótico usado para deleccionar *ta4_{ST}*. El mutante de delección “limpio” mostró un fenotipo idéntico al mutante original (Figura 24).

Figura 22. La supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* es regulada por un grupo reducido de sistemas TA. A) Los siete módulos TA tipo II y los tres tipo I cuyos componentes fueron detectados por proteómica o cuyos ARNm estaban inducidos en la bacteria intracelular (Tabla 5 y Figura 20), fueron inactivados en una serie de mutantes isogénicos de *S. Typhimurium* SL1344 que se ensayaron en supervivencia intracelular en fibroblastos BJ-5ta. **B)** Ensayo de proliferación en células epiteliales HeLa con aquellos mutantes de sistemas TA que mostraron una supervivencia reducida en fibroblastos BJ-5ta. El índice de proliferación se determinó como la relación entre el número de bacterias viables a 24 h post-infección y el número de bacterias a 2 h post-infección. Los datos muestran la media y la desviación estándar de un mínimo de tres experimentos independientes normalizados frente a la estirpe silvestre de *S. Typhimurium* SL1344. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y post-test de Dunnet. *, $P = 0,01-0,05$, **, $P = 0,001-0,01$ ***, $P < 0,001$.

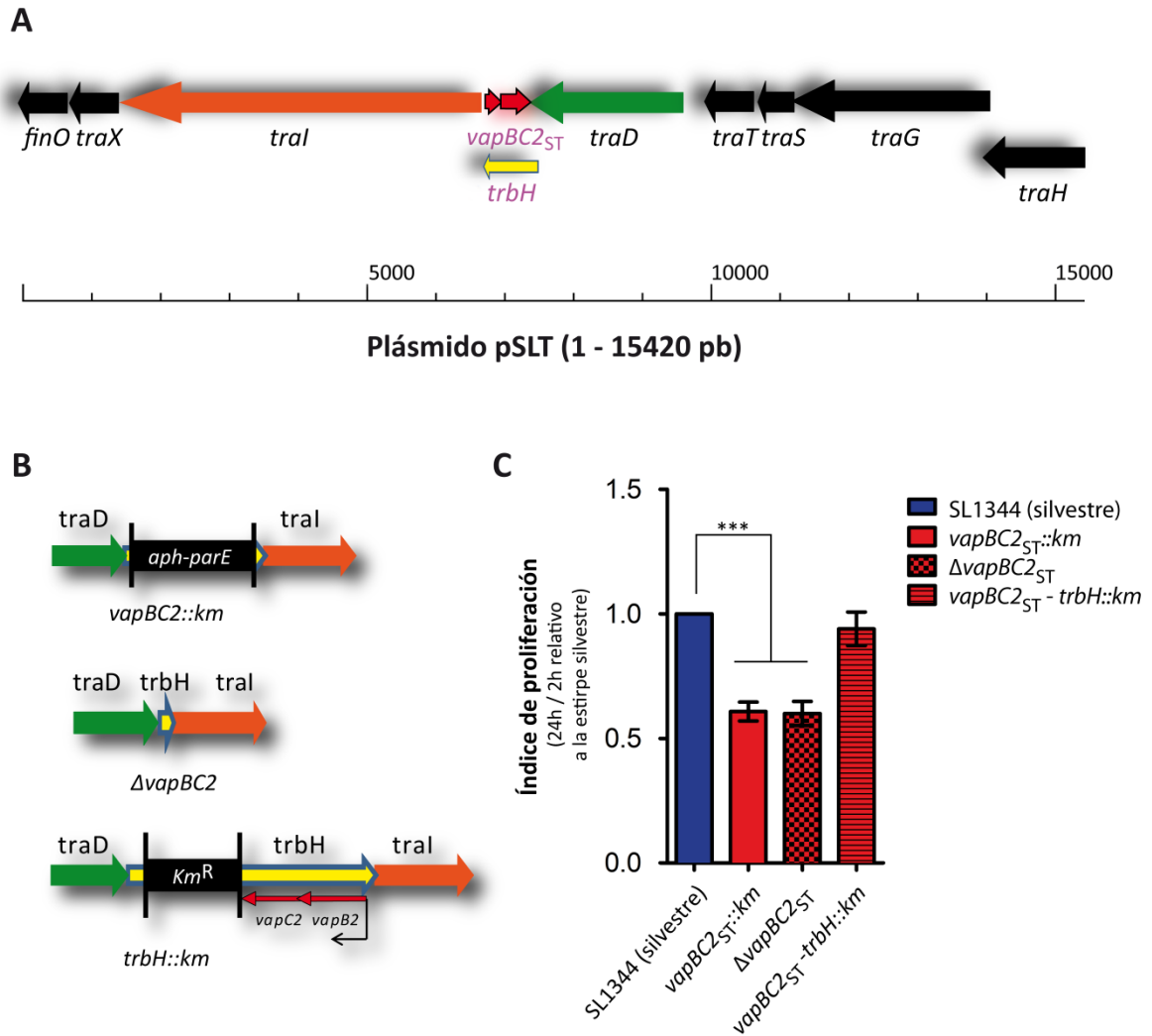


Figura 23. Experimento control demostrativo de que el sistema *vapBC2_{ST}* es necesario para la supervivencia de *S. Typhimurium* en fibroblastos BJ-5ta. A) Contexto genómico del operón *vapBC2_{ST}* en el plásmido de virulencia pSLT. *vapB2_{ST}* y *vapC2_{ST}* solapan completamente con el gen *trbH*. B) Esquema de los mutantes diseñados para el operón *vapBC2* que fueron utilizados en ensayos de supervivencia y proliferación intracelular. C) Índice de proliferación de las estirpes del panel B. Los mutantes *vapBC2::km* y Δ *vapBC2_{ST}* mostraron una baja tasa de supervivencia intracelular, fenotipo no observado para el mutante *vapBC2_{ST}-trbH::Km*. El índice de proliferación se determinó acorde a lo descrito en la figura 22. Los datos muestran la media y la desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes normalizados frente a la estirpe silvestre de *S. Typhimurium* SL1344. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y post-test de Dunnet. *, $P < 0,001$.**

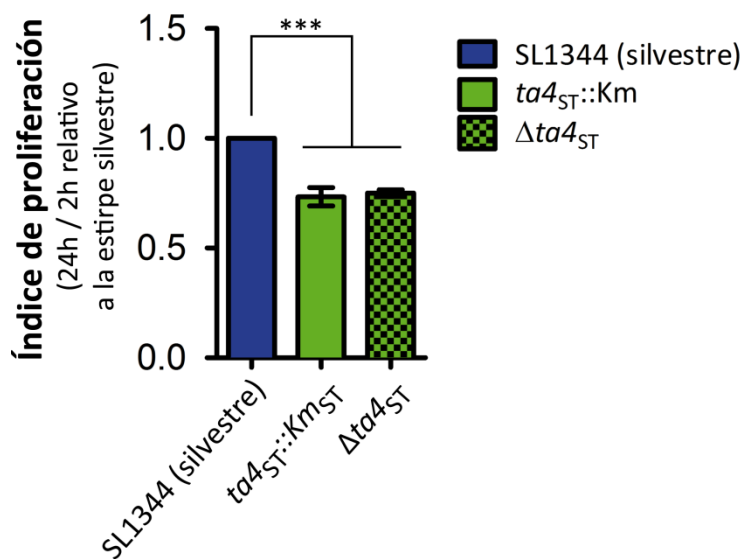


Figura 24. Experimento control demostrativo de que el sistema $ta4_{ST}$ es necesario para la supervivencia de *S. Typhimurium* en fibroblastos BJ-5ta. Se midió el índice de proliferación de las estirpes $ta4::km$ y $\Delta ta4_{ST}$ (en la que se eliminó el módulo *aph-parE*). El valor obtenido en ambos casos fue el mismo. El índice de proliferación se determinó como el cociente entre el número de bacterias viables a 24 h post-infección y el número de bacterias a 2 h post-infección. Los datos muestran la media y la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes normalizados frente a la estirpe silvestre de *S. Typhimurium* SL1344. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y post-test de Dunnet. ***, $P < 0,001$.

Los mutantes carentes de sistemas TA de S. Typhimurium con baja tasa de supervivencia intracelular no muestran defecto en la invasión de fibroblastos en cultivo.

Se midió la tasa de invasión de fibroblastos humanos BJ-5ta, (Figura 25A) y de células epiteliales HeLa (Figura 25B) en las estirpes en las que se inactivaron los sistemas TA $hok-sok_{ST}$, $ldrA-rdIA_{ST}$, $tisB-istR_{ST}$, $ta4_{ST}$ y $vapBC2_{ST}$. En ningún caso se observaron diferenciadas con la estirpe parental *S. Typhimurium* SL1344.

La baja supervivencia intracelular de los mutantes carentes de de sistemas TA no se relaciona con cambios en su capacidad de crecimiento en medios de laboratorio.

La baja capacidad adaptativa a la vida intracelular mostrada por algunos de los mutantes TA de *S. Typhimurium* SL1344 podía deberse a un defecto generalizado en la capacidad de crecimiento de estas estirpes. Para comprobar esta posibilidad, se midieron las curvas de crecimiento en medio LB para los mutantes $\Delta hok-sok_{ST}$, $\Delta ldrA-rdIA_{ST}$, $\Delta tisB-istR_{ST}$, $\Delta ta4_{ST}$ y $\Delta vapBC2_{ST}$ (Figura 26). En todos los casos se observó una velocidad de crecimiento idéntica a la de la estirpe silvestre.

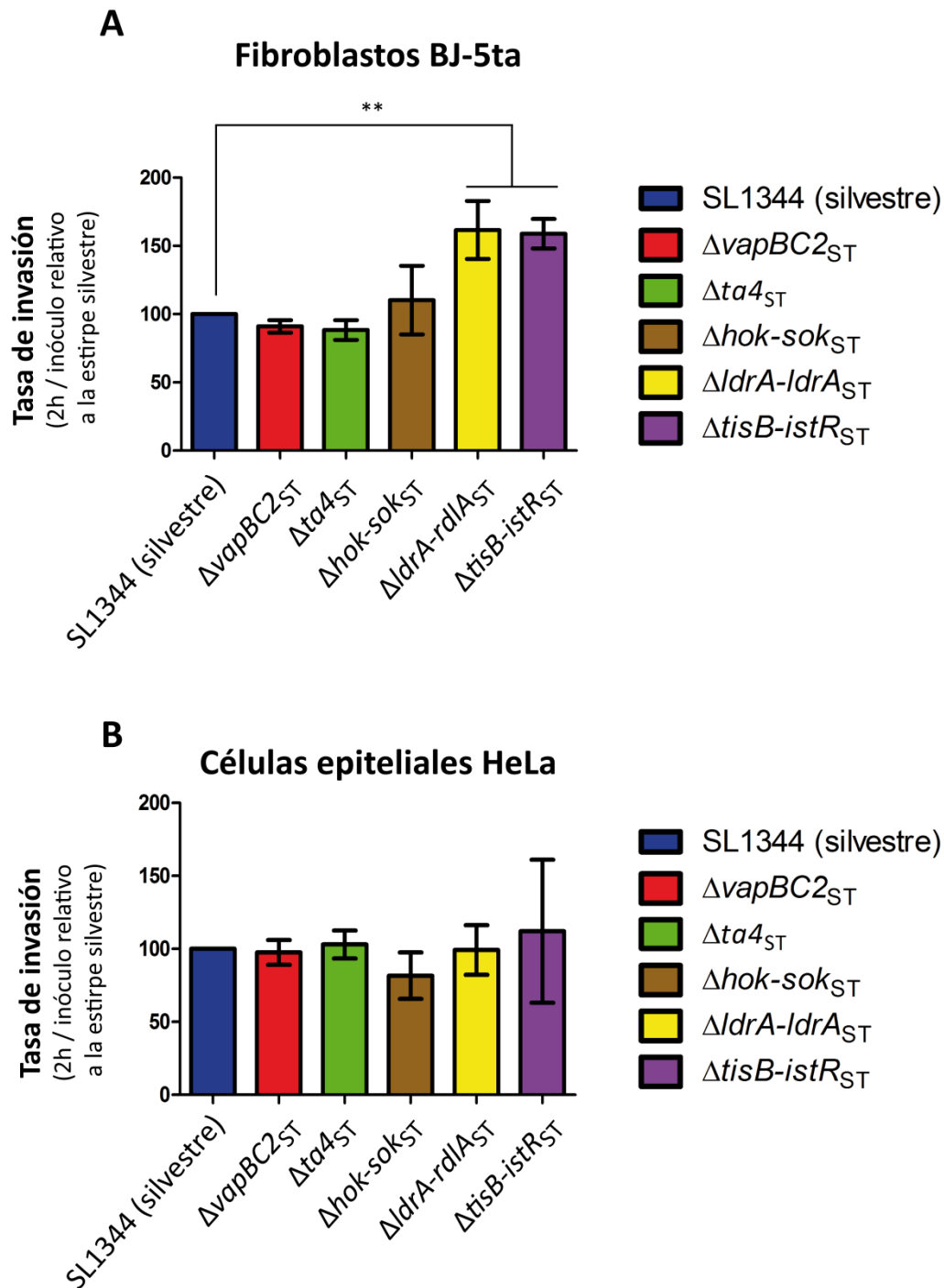


Figura 25. Ausencia de fenotipo en tasa de invasión en los mutantes en sistemas TA con supervivencia intracelular reducida. Se muestra la tasa de invasión de los diversos mutantes en sistemas TA tipo I y II en fibroblastos humanos BJ-5ta **(A)** y células epiteliales HeLa **(B)**. El porcentaje de invasión se valoró como el cociente entre el número de bacterias viables a 2 h post-infección y el número de bacterias presentes en el inóculo usado para infectar las células eucariotas. Se muestran las medias y desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes, normalizados frente a la estirpe silvestre de *S. Typhimurium* SL1344. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y post-test de Dunnett. **, $P = 0,001 - 0,01$.

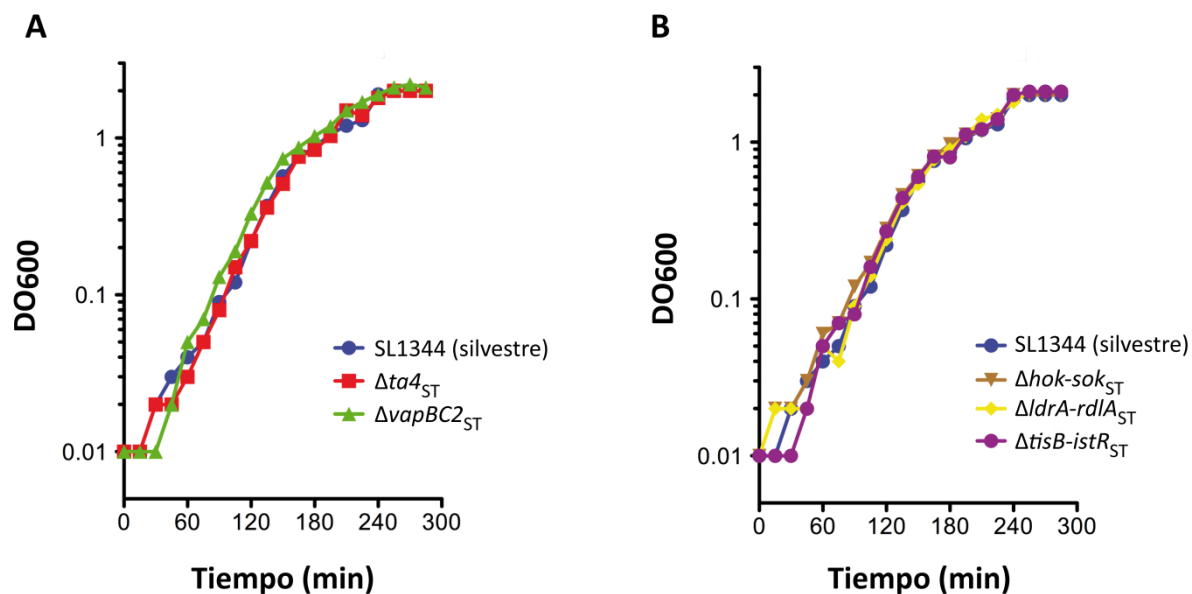


Figura 26. Crecimiento en medio LB de los mutantes de *S. Typhimurium* que carecen de los sistemas TA necesarios para la supervivencia intracelular en células eucariotas. Todas las estirpes se crecieron en medio LB a 37°C con 125 rpm de agitación. **A)** Estirpe silvestre y mutantes de delección de los sistemas TA tipo II. **B)** Estirpe silvestre y mutantes de delección de los sistemas TA tipo I. Tanto para los mutantes en sistemas tipo I como tipo II, la delección de los módulos TA no afectó su capacidad de crecimiento.

Los sistemas TA de S. Typhimurium importantes para la supervivencia en fibroblastos humanos son también importantes para la supervivencia en otro tipo de fibroblastos.

Las cinco estirpes mutantes en sistemas TA que presentaron un fenotipo de supervivencia disminuido en fibroblastos BJ-5ta, se utilizaron en ensayos de infección de una segunda línea de fibroblastos, en este caso de rata (NRK-49F). Esta línea celular se caracteriza por limitar la proliferación de *S. Typhimurium*, más incluso que los fibroblastos humanos (Cano y col., 2001). Se quiso confirmar la hipótesis de si determinados sistemas TA responden específicamente durante la infección de tipos celulares donde el crecimiento está limitado. A diferencia de lo observado en las células epiteliales HeLa, donde la proliferación de *S. Typhimurium* es muy acusada y sólo $vapBC2_{ST}$ parece contribuir a la supervivencia intracelular, los sistemas TA necesarios para supervivencia en fibroblastos humanos BJ-5ta cumplen una función similar en fibroblastos de rata NRK-49F (Figura 27). Únicamente el mutante $\Delta tisB-istR$ no mostró un defecto en la supervivencia intracelular estadísticamente significativo. Además, en los fibroblastos NRK-49F la delección del sistema $vapBC2_{ST}$ resultó en un fenotipo más acusado que en fibroblastos humanos, causando una bajada en el número de bacterias viables de casi el 80% con respecto a la estirpe silvestre.

Fibroblastos NRK-49F

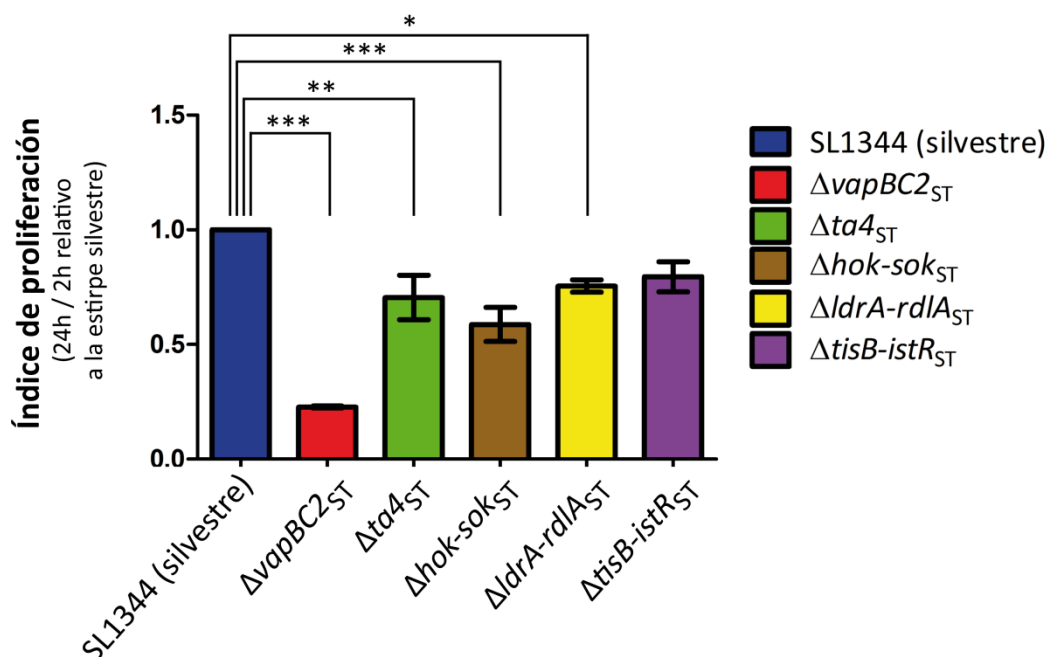


Figura 27. Contribución de los sistemas TA a la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en fibroblastos de rata NRK-49F. Salvo el caso de $\Delta tisB-istR_{5T}$, los mismos mutantes que habían mostrado una supervivencia disminuida en el modelo de fibroblasto humano, mostraron la misma alteración en supervivencia en la línea de fibroblasto de rata. Además el mutante $\Delta vapBC2_{ST}$, presentó una supervivencia aún más reducida en este tipo celular. El índice de proliferación se determinó acorde a lo descrito en la figura 22. Los datos muestran la media y la desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes, normalizados frente a la estirpe silvestre de *S. Typhimurium* SL1344. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y post-test de Dunnet. *, $P = 0,01 - 0,05$; *, $P = 0,001 - 0,01$; ***, $P < 0,001$.

Los sistemas TA que contribuyen a la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en fibroblastos no actúan sinérgicamente.

Puesto que varios sistemas TA contribuyen a la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium*, se quiso analizar el efecto que podría tener la inactivación simultánea de varios de ellos. Se eliminaron secuencialmente todos los sistemas TA que habían mostrado una supervivencia reducida en el modelo de fibroblasto BJ-5ta, siguiendo el orden $\Delta ta4_{ST}$, $\Delta vapBC2_{ST}$, $\Delta hok-sok_{ST}$, $\Delta ldrA-ldrA_{5T}$ y $\Delta tisB-istR_{5T}$. De esta forma, se obtuvieron mutantes con 2 ($\Delta 2$), 3 ($\Delta 3$), 4 ($\Delta 4$) y 5 ($\Delta 5$) sistemas TA inactivados. Los ensayos de infección demostraron que la eliminación secuencial estos sistemas TA no aumentaba el defecto en la supervivencia intracelular en ninguna de las dos líneas de fibroblastos ensayadas (Figura 28A y 28B). Estos datos podrían indicar que no existe un efecto sinérgico entre estos sistemas TA y que quizá todos ellos inciden en procesos relacionados.

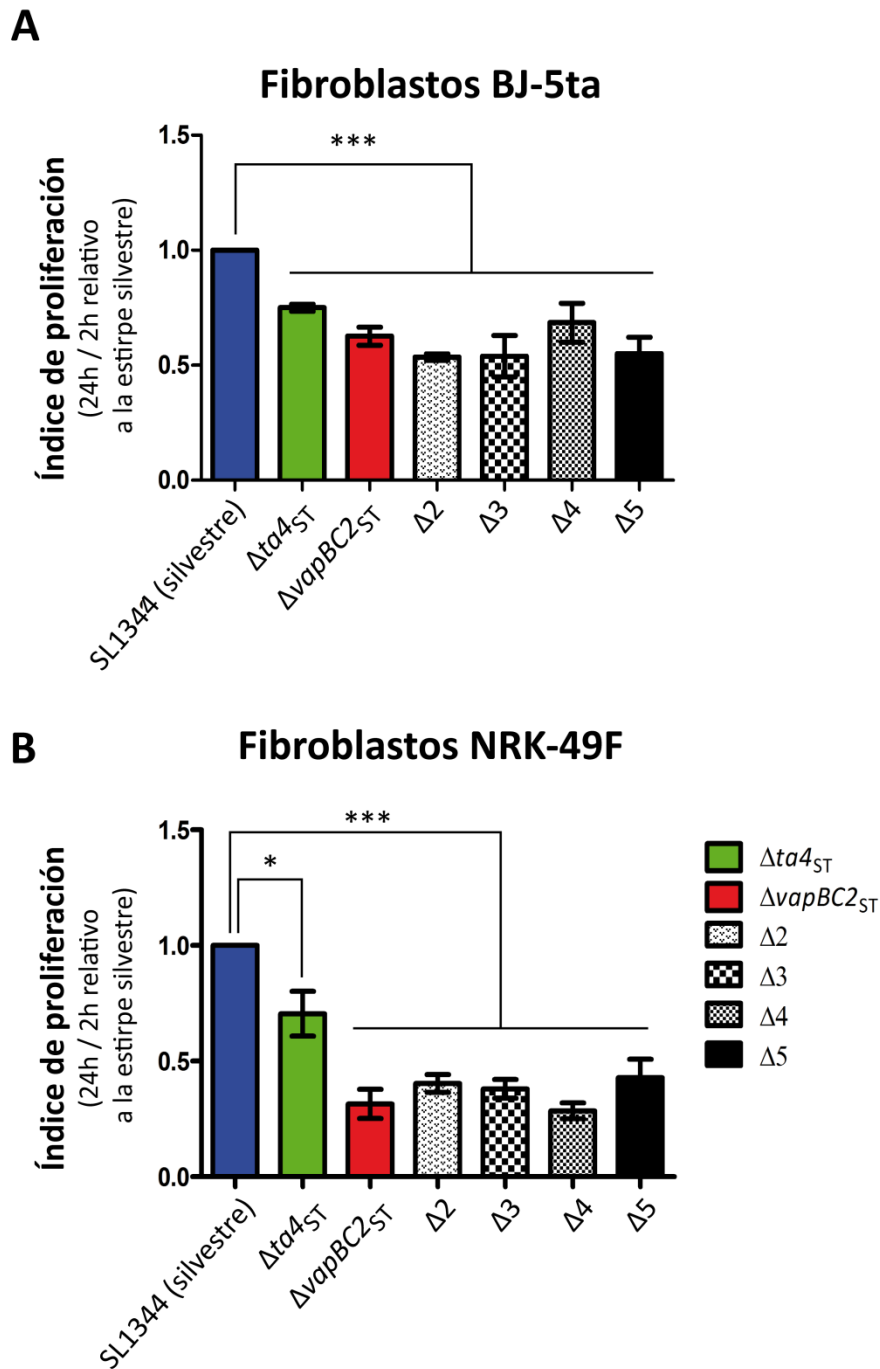


Figura 28. La delección de múltiples sistemas TA no produce un efecto aditivo en la pérdida de supervivencia en fibroblastos. Se muestran las tasas de supervivencia intracelular de los mutantes $\Delta ta4_{ST}$ y $\Delta vapBC2_{ST}$, así como los cuatro mutantes múltiples construidos en fibroblastos humanos BJ-5ta (**A**) y fibroblastos de rata NRK-49F (**B**). El número de bacterias intracelulares viables se determinó a 2 y 24 h post-infección. Los datos muestran la media y la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes, normalizados frente a la estirpe silvestre de *S. Typhimurium* SL1344. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y post-test de Dunnet. *, $P = 0,01 - 0,05$; ***, $P < 0,001$.

DISCUSIÓN

La cepa SL1344 de Salmonella enterica serovar Typhimurium posee 18 sistemas toxina-antitoxina funcionales.

El avance de las herramientas informáticas unido al cada vez mayor número de genomas bacterianos secuenciados ha aumentado considerablemente el conocimiento sobre la distribución y funcionamiento de posibles sistemas toxina-antitoxina (TA) (Pandey y Gerdes, 2005, Makarova y col., 2009, Ramage y col., 2009, Fozo y col., 2010, Shao y col., 2011, Sberro y col., 2013). En la mayoría de bacterias y arqueas se han detectado este tipo de módulos TA aunque aún se desconoce por qué estos organismos poseen tantos. Curiosamente, mientras que algunos patógenos como *M. tuberculosis* contiene más de 80 posibles sistemas TA (Ramage y col., 2009), en otros como *Mycobacterium marinum* o *S. pneumoniae* cepa R6 se han identificado solamente dos y cinco posibles sistemas TA, respectivamente (Ramage y col., 2009, Shao y col., 2011). Trabajos previos a esta Tesis Doctoral habían demostrado que las bacterias patógenas poseen en general un mayor número de módulos TA que bacterias no patógenas filogenéticamente relacionadas (Ramage y col., 2009, Georgiades y Raoult, 2011). Tomando como punto de partida estas observaciones, quisimos conocer si esta diferencia se cumpliría en la estirpe SL1344 de *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium. Identificamos 27 posibles sistemas TA en esta estirpe, siete de tipo I y 20 de tipo II. Por el contrario, no detectamos ningún sistema perteneciente al resto de tipos. Un problema con este tipo de análisis es la disyuntiva creada entre los resultados obtenidos *in silico* y los resultados experimentales. La identificación *in silico* de sistemas TA suele basarse en características de estos módulos como la existencia de operones bicistrónicos y la presencia de dominios de interacción con ADN (en el caso de las antitoxinas de los sistemas TA tipo II). Además, clásicamente se ha seguido el principio de "*guilt by association*", según el cual si un posible gen codificante de una toxina o antitoxina está próximo a otra gen desconocido en un operón bicistrónico se asume que el segundo gen codifica la antitoxina o toxina que acompaña a la primera. Durante la búsqueda de sistemas TA identificamos ciertos candidatos que correspondían a genes bien caracterizados y no relacionados con sistemas TA. Así por ejemplo, en la base de datos de sistemas TA tipo II descrita por Leplae y colaboradores (Leplae y col., 2011) se anotaron como posibles sistemas TA de *S. Typhimurium* una metiltransferasa del 23S ARNr o una subunidad de un transportador de aminoácidos. Por ello, consideramos indispensable que para dotar de significancia a estas predicciones era necesario ensayar funcionalmente los 27 posibles sistemas TA inicialmente identificados en *S. Typhimurium* SL1344. Se confirmó la funcionalidad de 18 de estos 27 módulos (Figura 8). Esta proporción de sistemas TA con funcionalidad demostrada es mayor que la descrita para otros patógenos como por ejemplo *M. tuberculosis*, donde de entre el total de más de 80 posibles sistemas, únicamente 30 parecen ser funcionales (Zhu y col., 2006, Ramage y col., 2009, Ahidjo y col., 2011). Entre los sistemas

TA inactivos encontrados en *S. Typhimurium* SL1344 se encontraron dos de tipo I (*ibsB-istR_{ST}* y *symER_{ST}*) y siete de tipo II (*ccdAB_{ST}*, *higBA_{ST}*, *relBE3_{ST}*, *ta1_{ST}*, *ta3_{ST}*, *pasT1_{ST}* y *vapBC_{ST}*). Estos sistemas se clasificaron en dos grupos atendiendo a cuál fue el componente no funcional: aquellos en los que la toxina no inhibió la viabilidad celular y aquellos en los que la antitoxina no pudo recuperar el fenotipo tóxico. Existen varias respuestas que podrían explicar la ausencia de función de algunos componentes. El primer grupo de sistemas TA no funcionales incluye las toxinas CcdB_{ST}, HigB_{ST}, lbsB_{ST}, SymE_{ST}, PasT_{ST}, T3_{ST} y VapC_{ST}. En el caso de las toxinas CcdB_{ST}, lbsB_{ST} y PasT_{ST}, la mutación de residuos importantes para la toxicidad de estas proteínas es la causa de la ausencia de función (Figuras 10-12) (Bahassi y col., 1995, Mok y col., 2010, Norton y Mulvey, 2012). En las toxinas HigB_{ST}, SymE_{ST}, T3_{ST} o VapC_{ST} no se encontraron mutaciones en aminoácidos importantes para la función de estas proteínas (Figuras 13 y 14) y se detectó una correcta expresión de todas ellas (Figura 16). Aunque SymE_{ST} presentó una alta homología con su ortólogo en *E. coli*, ciertas sustituciones de aminoácidos podrían ser importantes para su toxicidad. Acorde a la falta de homología de las proteínas HigB_{ST} y T3_{ST} con otras toxinas descritas, se podrían descartar estos dos módulos como auténticos sistemas TA, quedando por tanto como falsos positivos detectados en la búsqueda informática. Como se comentó anteriormente, ciertos parámetros de búsqueda de sistemas TA pueden sesgar la identificación de este tipo de módulos.

VapC_{ST} había sido previamente caracterizada como una formil-metionina tARNasa (Winther y Gerdes, 2011). En el trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral, así como estudios previos (De la Cruz y col., 2013), la expresión ectópica de VapC_{ST} desde plásmidos recombinantes no da lugar a un descenso de la cultivabilidad o capacidad de crecimiento de la bacteria. Existen otros precedentes en la literatura en los que dependiendo del sistema modelo empleado para confirmar la funcionalidad de una toxina se obtiene un resultado positivo o negativo. Por ejemplo, al analizar las proteínas ortólogas a VapC, Rv0595c, Rv2549c, Rv3320c, Rv2010 y Rv2548 de *M. tuberculosis*, se identificaron en un estudio como toxinas funcionales Rv0595c, Rv2549c y Rv3320c, y como no funcionales Rv2010 y Rv2548 (Ahidjo y col., 2011). Por el contrario, en un segundo trabajo Rv0595c, Rv2549c y Rv3320c no mostraron un fenotipo tóxico claro, efecto que sí se observó con Rv2010 y Rv2548 (Ramage y col., 2009). Se ha descrito además, que la expresión ectópica de ciertas toxinas funcionales no da lugar a un fenotipo tóxico claro, como resultado de problemas de solubilidad/agregación (Arcus y col., 2004, Bunker y col., 2008, McKenzie y col., 2012a). Además, se sabe que la toxina Rv3320c de *M. tuberculosis* únicamente inhibe el crecimiento bacteriano cuando la proteína se expresa de una manera constante (Ahidjo y col., 2011). En línea con estas observaciones, cuando se llevó a cabo el análisis microscópico de la estirpe en la que se había inducido la expresión de VapC_{ST}, se detectó una morfología celular claramente alterada, caracterizada principalmente por la presencia de cuerpos de

inclusión (Figura 17). Este hecho se correlaciona con la elevada expresión de esta toxina desde el plásmido recombinante en el que está codificada (Figura 16). Aunque esta podría ser la explicación de una ausencia de toxicidad en VapC_{ST}, resulta llamativo que el vector de expresión empleado por Winther y colaboradores (Winther y Gerdes, 2011) en su trabajo, (pBAD33, derivado de pACYC184 que contiene un promotor P_{Ara}), es similar al empleado en esta tesis doctoral (pFUS2 que contiene un promotor P_{Ara}). El promotor empleado en ambos casos es el mismo, y el número de copias de pBAD33 y pFUS2 muy similar.

Otro grupo de posibles sistemas TA que no mostraron actividad comprende los dos sistemas TA tipo II *relBE3_{ST}* y *ta1_{ST}*, cuyas antitoxinas no neutralizaron el efecto tóxico de sus toxinas (Figura 8). Además de lo discutido para las toxinas no funcionales podrían existir otras explicaciones para la ausencia de actividad en las antitoxinas RelB3_{ST} y A1_{ST}. El hecho de que la expresión de un gen de lugar a un efecto tóxico no conlleva necesariamente a catalogar dicho gen dentro de un sistema TA. En algunos casos, la sobreproducción de una proteína perteneciente a una pareja de proteínas que actúan coordinadamente en determinados procesos celulares es perjudicial y provoca una inhibición del crecimiento bacteriano. Un claro ejemplo son las proteínas DnaC y DnaB de *E. coli*. DnaC es la proteína implicada en acoplar la helicasa DnaB al ADN, como paso imprescindible para la replicación del cromosoma. Sin embargo, la producción descompensada de DnaC resulta tóxica para la bacteria al inhibir la actividad helicasa de DnaB. Por el contrario, la expresión simultánea de DnaC y DnaB libera la inhibición de crecimiento mediada por DnaC (Allen y Kornberg, 1991). Este hecho podría hacer pensar que DnaC y DnaB constituyen un sistema toxina-antitoxina, cuando no es así. En este sentido, a pesar de la inhibición de crecimiento provocada por las toxinas RelE3_{ST} y T1_{ST}, ambas proteínas podrían no ser auténticas toxinas. Como norma, se ha establecido que para que una proteína tóxica forme parte de un sistema TA la función de inhibición de crecimiento debe ser su función principal (Gerdes, 2013).

Las supuestas antitoxinas RelB3_{ST} y A1_{ST} podrían no ser las antitoxinas de los sistemas y que éstas se encuentren codificadas en algún otro punto del genoma de *S. Typhimurium*. Un caso de este tipo se ha descrito para el ortólogo de *mazEF* de *E. coli* en *Myxococcus xanthus* (MazF_{MX}). La toxina MazF_{MX}, implicada en la formación del cuerpo fructífero en esta bacteria no aparece codificada junto a su antitoxina, la cual se encuentra codificada varias megabases después en el genoma (Nariya y Inouye, 2008). En los casos de *relBE3_{ST}* y *ta1_{ST}* ambos sistemas se detectaron como operones bicistrónicos y no como toxinas aisladas. Además, en ambos sistemas, y especialmente en *relBE3_{ST}*, los genes de la toxina y la antitoxina se encuentran solapantes, característica habitual de los operones TA.

Otra posible explicación a la ausencia de función de las antitoxinas RelB3_{ST} y A1_{ST} podría ser la necesidad de un tercer componente que contribuyese a la neutralización de las respectivas toxinas

RelE3_{ST} y T1_{ST}. El módulo *higBA* de *M. tuberculosis* incluye un tercer componente codificado justo después de la antitoxina. Este gen codifica una chaperona imprescindible para el correcto plegamiento de la antitoxina HigA y sin la cual no se produce una correcta neutralización de la toxina (Bordes y col., 2011). Ni *relBE3*_{ST} ni *ta1*_{ST} tienen otros posibles componentes adyacentes codificados en la misma hebra del ADN, lo cual difiere del módulo *higBA* de *M. tuberculosis*. Esto no descarta la posibilidad de la presencia de un tercer componente importante para la neutralización, codificado en otro punto del genoma.

***S. Typhimurium* SL1344 posee un mayor número de sistemas TA que la especie no patógena *S. bongori*.**

El análisis de los genomas de *S. bongori* y *S. enterica* indica que divergieron de su ancestro común hace 40-63 millones de años (McQuiston y col., 2008). La comparación de ambas especies permite identificar posibles cambios en su contenido génico que llevaron a la especiación y adaptación de *S. enterica* a organismos eucariotas. *S. enterica* posee un mayor número de islas de patogenicidad (en las que se codifican la mayoría de factores de virulencia) y rutas metabólicas adicionales necesarias para una infección productiva (Fookes y col., 2011). Siguiendo esta línea, al analizar la distribución de los sistemas TA identificados en el genoma de *S. Typhimurium* SL1344 se observó que la mayoría de módulos están presentes en otros serovares y que, por el contrario, no se identifican en el genoma de la especie no patógena *S. bongori* (Figura 18). Algunas excepciones son sistemas TA que presentan una distribución más restringida a *S. Typhimurium*, como son los casos de *ccdAB*_{ST}, *hok-sok*_{ST}, *relBE4*_{ST} o *vapBC2*_{ST}. Estos módulos están codificados en plásmidos que el resto de serovares no posee. El resultado de nuestro análisis *in silico* de identificación de sistemas TA difiere parcialmente de un reciente estudio previo (De la Cruz y col., 2013). Parte de estas discordancias se deben probablemente al tipo de análisis comparativo empleado. Mientras De la Cruz y colaboradores emplearon *BLASTP*, que únicamente compara una secuencia de aminoácidos, la base de datos que nosotros utilizamos, descrita por Nuccio y Bäumlér (Nuccio y Bäumlér, 2014), y las búsquedas *TBLASTN* complementarias son mucho más precisas y exhaustivas. Este análisis a nivel de secuencia de nucleótidos permite distinguir sistemas que poseen una elevada homología y que de otro modo podrían aparecer como un único candidato. El criterio seguido por De la Cruz y colaboradores para la elección de los sistemas TA, que fueron posteriormente ensayados en los modelos de infección de macrófago y ratón, se basó en la selección de sistemas TA cromosómicos que estuviesen presentes en las estirpes patógenas capaces de infectar animales de sangre caliente. Sin embargo, ese estudio no analiza los plásmidos de *S. Typhimurium*, no aborda los sistemas TA tipo I y no llega a identificar dos posibles sistemas cromosómicos (*relBE2*_{ST} y *relBE3*_{ST}, códigos de acceso STM4449-50 y STM3777-78,

respectivamente) presentes en todas las estirpes patógenas (De la Cruz y col., 2013). Además, las toxinas de los sistemas TA *sehAB* y *sehCD* elegidos en su estudio no mostraron una clara inhibición de crecimiento en medio líquido. Contrariamente, nosotros pudimos detectar una funcionalidad completa en estos dos sistemas TA.

El mayor número de sistemas TA identificados en *S. Typhimurium* con respecto a *S. bongori* podría señalar a estos módulos como genes accesorios que *S. enterica* habría incorporado por transferencia génica horizontal, dotándole de una ventaja en la infección de organismos eucariotas. Otra posibilidad podría ser que el ancestro común a *S. enterica* y *S. bongori* tuviera un gran repertorio de sistemas TA y que únicamente *S. bongori* hubiese perdido muchos de estos sistemas TA en su evolución.

Inducción de toxinas de sistemas TA por S. Typhimurium SL1344 en el interior de células eucariotas.

La presencia de tan elevada cantidad de módulos TA funcionales en el genoma de *S. Typhimurium* incide en la pregunta de cuál puede ser la presión selectiva que los ha mantenido durante la evolución en este patógeno. Esta presión podría estar relacionada con la mejor adaptación ante distintos tipos de estrés propiciada por los sistemas TA (Gerdes, 2013) y el hecho que *S. Typhimurium* subsiste en el interior de una vacuola con pH ligeramente ácido y escasa concentración de nutrientes (Steeb y col., 2013). Los ensayos de espectrometría de masas y RT-qPCR demostraron que *S. Typhimurium* SL1344 expresa diversos genes y proteínas de sistemas TA en el interior de fibroblastos BJ-5ta infectados. Se detectaron componentes de diez sistemas TA en la bacteria intracelular, comprendiendo módulos de tipo I y II (Tabla 5 y Figura 20). Además, cuando se comparó la expresión de las cuatro toxinas de sistemas TA tipo II T2_{ST}, T4_{ST}, T5_{ST} y VapC2_{ST} en bacteria crecida extracelular e intracelularmente, todas las toxinas aparecieron claramente inducidas en la bacteria intracelular. Los ensayos de RT-qPCR demostraron también que las toxinas de los sistemas TA tipo I Hok_{ST}, LdrA_{ST} o TisB_{ST} (Figura 20) se inducen en la bacteria intracelular. Estos resultados concuerdan en parte con un reciente estudio llevado a cabo en macrófagos infectados con *S. Typhimurium* 12023. En este trabajo se pudo determinar la expresión aumentada de 14 genes que codifican toxinas de sistemas TA tipo II cuando la bacteria crece dentro de macrófagos (Helaine y col., 2014). Además, estos autores demostraron que el incremento de transcripción en las toxinas disminuye cuando se aumenta, artificialmente, el pH (normalmente ácido) de la vacuola, lo cual estaría en consonancia con el hecho de que ciertos módulos TA responden a pH ácido (Kwan y col., 2014). Según estos autores, la activación sistemática de módulos TA facilita la formación de células persistentes en el interior del macrófago (Helaine y col., 2014). Cabe señalar que estos autores únicamente analizaron 14 de los

sistemas que posee *S. Typhimurium* SL1344, descartando todos los módulos tipo I y los presentes en el plásmido de virulencia pSLT (*ccdAB_{ST}* y *vapBC_{2ST}*). Además, las pruebas de toxicidad y neutralización realizadas en esta Tesis Doctoral demuestran que algunos de los sistemas analizados en ese estudio podrían no ser funcionales.

Otros grupos han descrito también el aumento de expresión de determinados sistemas TA durante la infección de células eucariotas (Ramage y col., 2009, Komi y col., 2014). Estas observaciones refuerzan la idea de los sistemas TA como módulos de respuesta a estrés que ejercen un papel importante en la fisiología de la bacteria en el entorno intracelular hostil de la célula eucariota.

Nuestra comparativa de la expresión de sistemas TA en bacteria intracelular tras la infección de fibroblastos o células epiteliales mostró una menor inducción de toxinas pertenecientes a sistemas TA tipo II cuando la bacteria crece activamente en células HeLa (Figura 21). En estas condiciones de infección sólo VapC_{2ST} mostró unos niveles claramente elevados. Se ha descrito que tras la infección de células epiteliales por *S. Typhimurium* una población de bacterias intracelulares escapa de la vacuola (SCV) y prolifera activamente en el citoplasma (Malik-Kale y col., 2012). Este comportamiento no se observa durante la infección de fibroblastos o macrófagos, donde la bacteria queda restringida a la SCV (Cano y col., 2001, Aiausti y col., 2010). Nuestros resultados podrían indicar que las condiciones del citoplasma de las células epiteliales HeLa podrían ser menos adversas que en la vacuola del fibroblasto resultando en una menor activación de las rutas que inducen los sistemas TA. En consonancia con estos resultados, Hautefort y colaboradores demostraron importantes diferencias en la respuesta de *S. Typhimurium* ante la infección de células HeLa y macrófagos (Hautefort y col., 2008). Al comparar el transcriptoma de bacterias extraídas de células HeLa con el de macrófagos, estos autores observaron una respuesta diferente en ambas poblaciones. Así por ejemplo, *mgtBC* y *pstACS*, implicados en captación de magnesio y fosfato, aparecieron inducidos en ambos tipos celulares, lo cual indicaría una ausencia de estos oligoelementos en la vacuola de ambos tipos celulares. Sin embargo, mientras que en macrófagos los niveles de *mgtBC* permanecieron elevados durante toda la infección (2 a 12 h post-infección), en células HeLa se detectó una reducción gradual de los niveles de ARNm de 2 h a 6 h post-infección. Los genes que codifican la superóxido dismutasa (*sodBC*), alkil hidroxiperoxidasa (*ahpCF*), catalasa (*katE*) y flavohemoglobina (*hmpA*), mostraron unos niveles disminuidos en células HeLa, lo cual reflejaría un menor estrés mediado por radicales de oxígeno y nitrógeno en esta línea celular (Hautefort y col., 2008). Además, la inducción en *S. Typhimurium* de genes regulados por pH ácido, como *pagC*, *cysB*, *adiY* o *marAB* en el interior de la SCV de macrófagos es consistente con la naturaleza ácida de esta vacuola (Rathman y col., 1996, Eriksson y col., 2003). En el interior de células epiteliales se redujeron o mantuvieron en los mismos niveles los transcritos de todos estos genes inducibles por pH ácido, a

excepción de *cysB*. Estos datos apoyan la idea de que la SCV del macrófago, de acuerdo a su carácter de célula fagocítica, es más ácida que la de la célula epitelial (Hautefort y col., 2008). Sin embargo, *S. Typhimurium* es capaz de escapar de la SCV en el interior de las células HeLa de tal manera que hasta un 20% de la población intracelular se encuentra localizada en el citoplasma (Malik-Kale y col., 2012). Esto explicaría por qué se reduce la expresión de los genes *mgtBC* o se induce la de genes relacionados con el metabolismo aeróbico y producción de ATP (Hautefort y col., 2008).

Si se comparan estos resultados con los datos de transcriptómica de la bacteria intracelular en fibroblastos, los resultados son más concordantes con los obtenidos en macrófagos. Así, los genes relacionados con la captación de magnesio y fosfato se encuentran también inducidos, al igual que *pagC* y *cysB*, los cuales responden a un ambiente con pH ácido (Nuñez-Hernández y col., 2013). Estos resultados apoyarían la hipótesis de que el ambiente intracelular más permisivo en células epiteliales que en fibroblastos o macrófagos no favorecería la activación de sistemas TA. En este escenario, el pH ácido y la escasez de nutrientes entre otros factores estimularían respuestas de estrés en el patógeno con la consiguiente activación de proteasas y ARNasas. Como consecuencia, se produciría una degradación preferencial de las antitoxinas con una activación transcripcional del operón TA, al menos en los sistemas TA tipo II, y un aumento de la expresión de los genes que codifican las toxinas.

Efecto de sistemas TA en la adaptación de S. Typhimurium al estilo de vida intracelular en fibroblastos y células epiteliales.

El análisis de mutantes defectivos en determinados sistemas TA mostró que *vapBC2_{ST}*, *ta4_{ST}*, *hok-sok_{ST}*, *ldrA-rdIA_{ST}* y *tisB-istR_{ST}* son importantes para la supervivencia intracelular del patógeno en fibroblastos BJ-5ta. Esta observación concuerda con el hecho de que, en este modelo de fibroblastos, las toxinas de estos cinco sistemas fueran detectadas en bacteria intracelular en cantidades mayores a las registradas en bacteria extracelular (Figuras 19B y 20). En células epiteliales esta concordancia entre fenotipo en infección y niveles intracelulares de toxina también se mantuvo. En este tipo celular únicamente aumento intracelularmente la expresión de la toxina VapC2_{ST} (Figura 21) y sólo el mutante carente de este sistema mostró una disminución del índice de proliferación (Figura 22). Conforme a lo descrito en la sección anterior, estos resultados estarían en línea con la hipótesis de que el ambiente intracelular en los fibroblastos es mucho más restrictivo que en las células HeLa.

Existen precedentes en la literatura en los que la pérdida de uno o más sistemas TA lleva asociado un fenotipo diferencial únicamente en determinados órganos o células diana. Así, los sistemas TA *ybaJ-hha* y *yefM-yoeB* de la cepa uropatogénica CFT073 de *E. coli* parecen ser importantes para la colonización de la vejiga, pero no de los riñones. De la misma manera el módulo *pasTI* de la misma cepa parece ser importante en la supervivencia bacteriana únicamente en los riñones (Norton y

DISCUSIÓN

Mulvey, 2012). Análogamente, el módulo *sehAB*, necesario para la virulencia sistémica de *S. Typhimurium* en el modelo de ratón, es prescindible en la infección de macrófagos *in vitro* (De la Cruz y col., 2013). Estos datos sugieren que las bacterias podrían activar de forma selectiva determinados sistemas TA en diversas condiciones ambientales.

Como se mencionó anteriormente, el sistema *vapBC*_{ST}, codificado en el plásmido de virulencia pSLT, fue el único que pareció ser importante en la adaptación intracelular de *S. Typhimurium* independientemente de la línea celular empleada. Los módulos *vapBC* codifican toxinas que poseen un dominio tipo PIN (del inglés PiIT N-terminal), siendo los sistemas TA tipo II más extendidos por los genomas bacterianos (Makarova y col., 2009, Leplae y col., 2011). En *M. tuberculosis* hay descritos más de 80 sistemas TA, de los cuales 27 son de tipo *vapBC* (Ramage y col., 2009). Los dominios PIN están formados por 140 aminoácidos, caracterizados por un cuarteto conservado de aminoácidos con carga negativa, configurados en una estructura similar a la ARNasa H (Arcus y col., 2004). De entre todos los sistemas TA, el dominio PIN de las toxinas tipo VapC es el único con homólogos en proteínas eucariotas. En este grupo se encuentran proteínas que participan en distintos procesos del metabolismo del ARN, incluyendo degradación no específica (Clissold y Ponting, 2000), maduración del ARNr (Pertschy y col., 2009) y reciclado del ARNm (Schaeffer y col., 2009). La toxinas VapC, poseen actividad ARNasa específica de secuencia (Daines y col., 2007, Ramage y col., 2009, Robson y col., 2009, Winther y Gerdes, 2009). Muchas toxinas, al igual que podría ocurrir con VapC_{ST}, son endorribonucleasas específicas de secuencia. La longitud y secuencia nucleótidos, y la estructura secundaria del ARN, determina el espectro de ARNs diferentes que estas toxinas reconocen y procesan. El caso más extremo descrito hasta la fecha es el de la toxina MazF_{HW} de la arquea halofílica *Haloquadratum walsbyi*. Esta toxina reconoce la secuencia de ARN de 7 bases UUACUCA (Yamaguchi y col., 2012). La especificidad de secuencia de las toxinas que actúan como endorribonucleasas permite la digestión selectiva de un determinado set de ARNs, produciendo un reajuste global del transcriptoma, y como consecuencia del proteoma de la bacteria (Christensen y col., 2001, Kim y col., 2010, McKenzie y col., 2012b). Un ejemplo de la selección específica de dianas por endorribonucleasas se ha descrito para el operón *vapBC* de *M. smegmatis*. Este sistema TA regula post-transcripcionalmente la captación y metabolismo de azúcares (McKenzie y col., 2012b). La secuencia de ARN reconocida por esta toxina VapC se encuentra en el ARNm de transportadores de azúcar y de otros genes implicados en rutas catabólicas de azúcares. La inactivación de este sistema TA provoca un consumo de glicerol superior a la tasa de consumo de glicerol necesaria para el crecimiento (McKenzie y col., 2012b).

Los datos anteriormente descritos señalan a los módulos *vapBC* como importantes “interruptores metabólicos” implicados en diferentes aspectos de la fisiología bacteriana. Así por ejemplo, los dos

operones *vapXD* y *vapBC-1* de *H. influenzae* contribuyen a la supervivencia intracelular y la virulencia de esta bacteria (Ren y col., 2012). Al deletar cualquiera de estos dos sistemas por separado se afecta la capacidad de supervivencia de la bacteria, tanto en un modelo *in vitro* similar a los cultivos de células eucariotas empleados en esta Tesis, como en un modelo de infección en otitis de chinchilla. Sin embargo, ninguno de los mutantes afectó de forma diferencial el daño que *H. influenzae* causa en los tejidos respiratorios (Ren y col., 2012). Estas observaciones sugieren que los sistemas TA no participan en la invasión, pero sí en la supervivencia o adaptación posterior en el interior del organismo. En consonancia con estos resultados, nuestros ensayos demostraron que si bien ciertos mutantes en sistemas TA como Δ *vapBC2_{ST}* tienen afectada la capacidad de supervivencia intracelular, en ningún caso se detectaron alteraciones en su capacidad invasiva (Figura 25).

En un reciente trabajo, se ha relacionado el sistema *vapBC-5* de *Sinorhizobium meliloti* con la fijación de nitrógeno en la leguminosa *Medicago sativa* (Lipuma y col., 2014). En su forma de vida libre las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno se encuentran en un ambiente, el suelo, donde hay constantes cambios de temperatura o escasez temporal de nutrientes. Al establecer la relación simbiótica con la planta, la bacteria se diferencia en su interior y su metabolismo se adapta a un nuevo ambiente microaerófilo con constante aporte de fuentes de carbono derivado de la planta. En este contexto, los sistemas TA podrían ser también importantes en la relación patógeno-hospedador regulando el necesario reajuste metabólico.

En relación al resto de sistemas TA que nuestros datos asignan un papel en la supervivencia de *S. Typhimurium* en fibroblastos (*ta4_{ST}*, *hok-sok_{ST}*, *ldrA-rdIA_{ST}* y *tisB-istR_{ST}*), no existen a nuestro conocimiento resultados similares en la literatura. El módulo *ta4_{ST}* no se pudo clasificar dentro de ninguna familia descrita de sistemas TA. La toxina T4_{ST} presenta un dominio homólogo a proteínas que tienen N-acetil-transferasa Gcn5 (GNAT) (Shao y col., 2011). Este dominio está presente en proteínas que utilizan acil-coenzima A como donador para la acetilación de lisinas (Vetting y col., 2005). Los dominios GNAT y la N-acetilación de lisinas se han relacionado con multitud de procesos, incluyendo resistencia a antibióticos, regulación de la expresión génica y control metabólico (Vetting y col., 2005, Spange y col., 2009). Como ejemplo, la actividad de la proteína Acs, implicada en la conversión de acetato en acil-coenzima A¹⁷, está modulada por la N-acetilación mediada por la proteína Pat (Starai y Escalante-Semerena, 2004a, Starai y Escalante-Semerena, 2004b). La actividad de Pat se ha relacionado además con el control del uso de fuentes de carbono y el metabolismo de la

¹⁷ Acetil-coenzima A es un intermediario esencial que conecta las rutas anabólicas y catabólicas. La proteína Acs combina acetato con ATP, formando acil-adenilato, para después transferir el grupo acetilo al grupo sulfhidrilo de la coenzima A, formando acil coenzima A. Esta reacción permite a la bacteria usar acetato durante el crecimiento aeróbico para generar energía a través del ciclo de Krebs y sintetizar distintos compuestos. Además, acetila CheY, proteína responsable de la respuesta quimiotáctica y movimiento flagelar.

bacteria gracias a la acetilación diferencial de diversas enzimas (Thao y Escalante-Semerena, 2011). Además de estas funciones, se ha descrito que Pat es capaz de regular la capacidad de unión a ADN del regulador RcsB (Thao y col., 2010). RcsB forma parte de un sistema regulador de tres componentes en *S. Typhimurium*, implicado en distintos procesos como división celular, formación de biopelículas y virulencia entre otros (Domínguez-Bernal y col., 2004, Latasa y col., 2012). El sistema Rcs contribuye a la represión de la expresión de varios genes de la SPI-1, genes codificantes de subunidades del flagelo y genes del plásmido *spvABC*, entre otros (Wang y col., 2007, García-Calderón y col., 2007). De manera similar a la proteína Pat, la baja tasa de supervivencia del mutante $\Delta ta4_{ST}$ en las dos líneas de fibroblastos ensayada podría estar relacionado con la actividad N-acetil transferasa de esta toxina y el reajuste metabólico que *S. Typhimurium* realiza en la célula huésped.

En referencia a los sistemas TA tipo I *hok-sok_{ST}*, *ldrA-rdIA_{ST}* y *tisB-istR_{ST}*, necesarios para la viabilidad de la bacteria intracelular que infecta fibroblastos, las toxinas son pequeños péptidos hidrofóbicos. Esta característica les proporciona capacidad para insertarse en la membrana y producir una reducción en los niveles de ATP al alterar el potencial transmembrana (Brantl, 2012, Wagner y Unoson, 2012, Yamaguchi y col., 2014, Steif y Meyer, 2012). Una activación “moderada” de estas toxinas en la bacteria intracelular podría llevar a un éxtasis metabólico, compatible con el estado de no crecimiento que *S. Typhimurium* muestra tras invadir el fibroblasto. Este modelo es consistente con la expresión aumentada de genes que codifican proteínas inducidas por fago (Psp) detectada en *S. Typhimurium* creciendo en el interior de células eucariotas (Núñez-Hernández y col., 2013, Eriksson y col., 2003). La respuesta mediada por proteínas Psp se induce por estrés acompañado de descenso energético de la bacteria. En esta línea, se ha descrito que la expresión ectópica de toxinas lbs incrementa la expresión de las proteínas del operón *psp* (Fozo y col., 2008b). Se podría por tanto especular sobre una posible conexión entre esta respuesta y las toxinas Hok_{ST}, LdrA_{ST} y TisB_{ST}.

A diferencia de las toxinas tipo Hok y TisB, la diana principal de las toxinas tipo Ldr no está claro que sea la membrana. Aunque LdrD es un péptido altamente hidrofóbico, su expresión genera una disminución en la fuerza protón motriz menor que otras toxinas (Gerdes, 2013). Además, se ha demostrado que la expresión ectópica de la toxina LdrD de *E. coli* da lugar a condensación del ADN (Kawano y col., 2002), característica no compartida por otras toxinas de sistemas TA tipo I. Estos datos indican que las toxinas tipo Ldr podrían tener una diana en la célula distinta de la membrana.

A nuestro conocimiento, existe un único precedente sobre la participación de un sistema TA tipo I en la infección de una bacteria patógena. Pinel-Marie y colaboradores identificaron un módulo TA tipo I de *S. aureus* compuesto por dos péptidos tóxicos y una única antitoxina (Pinel-Marie y col., 2014). Aunque ambos péptidos son detectables inicialmente en la fracción de la membrana celular bacteriana son posteriormente secretados al medio extracelular. La síntesis *in vitro* y posterior

adición de estos péptidos a cultivos de eritrocitos y otras bacterias como *E. coli* produce hemólisis e inhibición del crecimiento, respectivamente. Con estos datos los autores defienden que este sistema podría participar en la virulencia de *S. aureus*. En el modelo de fibroblasto, los sistemas TA de *S. Typhimurium* *hok-sok*_{ST}, *ldrA-rdlA*_{ST} y *tisB-istR*_{ST} podrían actuar de forma similar, de tal manera que sus toxinas podrían interferir con la homeostasis de membranas del hospedador. Apoyando esta hipótesis, distintos trabajos muestran que determinados factores de virulencia de *S. Typhimurium* son secretados independientemente de los sistemas de secreción tipo III, siendo transportados a través de vesículas formadas a partir de la membrana externa (Yoon y col., 2011). En un hipotético caso las toxinas mencionadas podrían ser transportadas de manera similar. Se ha demostrado además, que las vesículas de membrana externa pueden permanecer en la SCV, interactuar con la membrana de la SCV o ser liberadas al citoplasma de la célula eucariota (García-del Portillo y col., 1997, Yoon y col., 2011).

Recientes análisis realizados sobre el genoma de *S. Typhimurium* muestran la existencia de un gran número de genes que codifican péptidos hidrofóbicos que podrían tener un papel regulador tras insertarse en la membrana y afectar la actividad de otras proteínas de membrana. En bacterias Gram-negativas existe un pequeño grupo de proteasas dependientes de ATP (proteasas AAA+) que degradan proteínas específicas (Baker y Sauer, 2006). FtsH, una proteasa tipo AAA+ unida a la membrana interna, juega un papel importante en el control de calidad de proteínas de membrana (Ito y Akiyama, 2005). MgtR, un péptido de *S. Typhimurium* de 30 aminoácidos y asociado a la membrana, promueve la degradación de la proteína de membrana MgtC por la proteasa FtsH. Se ha postulado como mecanismo implicado una interacción MgtR-MgtC que da como resultado la desnaturalización de MgtC, haciéndola susceptible a su degradación por FtsH (Alix y Blanc-Potard, 2008). El gen *mgtC*, expresado conjuntamente a *mgtR*, codifica un factor de virulencia de la SPI-3, importante en la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en macrófagos (Blanc-Potard y Groisman, 1997). Contrariamente a MgtR de *S. Typhimurium*, se ha descrito en *Bacillus subtilis* un péptido de tan sólo 26 aminoácidos (SpoVM), capaz de inhibir la proteasa FtsH y regular por tanto, de forma indirecta, la proteólisis de múltiples proteínas aún no caracterizadas (Cutting y col., 1997). Otro ejemplo de regulación por un pequeño péptido hidrofóbico es el caso de YneN. Este péptido de *E. coli* conecta dos sistemas de dos componentes, EvgA/EvgS y PhoP/PhoQ, ya que su producción es inducida por el primero, activando posteriormente la transcripción de los genes regulados por PhoP a través de su interacción con PhoQ (Eguchi y col., 2007).

Estos ejemplos sugieren que pequeños péptidos hidrofóbicos, como son las toxinas Hok_{ST}, LdrA_{ST} o TisB_{ST}, podrían regular positiva o negativamente la actividad/estabilidad de otras proteínas de membrana. Este postulado se apoya también en evidencias que muestran inducción de genes que

codifican proteínas de membrana de respuesta a estrés en respuesta a la sobreproducción de algunas toxinas de sistemas TA tipo I (Fozo y col., 2008b). Además diferentes péptidos dan lugar a la activación de los mismos o distintos patrones de inducción génica, lo que reforzaría la hipótesis de regulación de distintos grupos de proteínas de membrana (Fozo y col., 2008b).

Hay que señalar también que existen sistemas TA tipo II en los que la antitoxina, además de actuar de represor transcripcional para el propio sistema, reprime también la expresión de otros genes. Este es el caso de los sistemas TA *mqsRA* y *dinJ-yafQ* de *E. coli*. El complejo TA MqsR:MqsA se une específicamente a las regiones promotora-operadora de los genes *cspD*¹⁸ y *rpoS*, y reprime la transcripción de ambos sistemas (Kim y col., 2010, Wang y col., 2011). Ante una situación de estrés (oxidativo), la degradación selectiva de la antitoxina MqsA da lugar a la activación de la transcripción de ambos genes y la respuesta de la bacteria. Otra antitoxina de *E. coli*, DinJ, también reprime *rpoS* pero en este caso mediante la proteína intermediaria CspE¹⁹ (Hu y col., 2012). Aunque en el caso de los sistemas TA tipo I no se ha identificado ninguna antitoxina capaz de interferir con otro gen que no sea el de su toxina, la propia naturaleza de estas moléculas podría hacer pensar en una regulación mediada por un ARN pequeño. Existen múltiples ejemplos de este tipo de regulación en bacterias y específicamente en *S. Typhimurium* (Bobrovskyy y Vanderpool, 2014, Calderón y col., 2014). En este contexto, el fenotipo encontrado para los cinco sistemas aquí descritos podría venir mediado sólo por la toxina, la antitoxina o ambos.

Los sistemas TA de S. Typhimurium que contribuyen a la supervivencia intracelular no actúan sinérgicamente.

Los estudios realizados con mutantes de *S. Typhimurium* carentes de diversos sistemas TA indicaron que podrían estar interfiriendo sobre procesos íntimamente relacionados. Se ha descrito un caso similar en los sistemas TA de *H. influenzae*. Al igual que ocurre con los cinco sistemas de *S. Typhimurium*, en el caso de *H. influenzae*, la delección conjunta de dos módulos tipo *vapBC*, que individualmente contribuyen a la supervivencia en el hospedador, el mutante que engloba a ambos sistemas TA no presenta un fenotipo diferencial (Ren y col., 2012). Varios factores podrían explicar estos resultados. Dado que los mutantes múltiples de *S. Typhimurium* ensayados en las pruebas de proliferación presentaban una reducción similar a la del mutante $\Delta vapBC_{2ST}$, cabía la posibilidad de que al ser este sistema TA el que más impacto tiene en la fisiología de la bacteria, el ensayo no

¹⁸ CspD es un inhibidor de la replicación del ADN inducible por estrés.

¹⁹ DinJ se une específicamente a la región palindrómica de unión de LexA situada en la región promotora de *cspE* y reprime su transcripción. De forma natural, CspE induce la traducción de *rpoS*. La inactivación de *cspE* elimina el efecto represor de DinJ sobre *RpoS*.

hubiera sido lo suficientemente sensible como para detectar un leve efecto aditivo. Otra posibilidad es que, aun teniendo un efecto sinérgico, fuese necesario (para ese efecto aditivo) inactivar otros sistemas TA que no hubieran sido detectados en proteómica o como inducidos en ensayos de RT-qPCR. En consonancia con esta idea, la persistencia de *E. coli* tras la exposición a antibióticos sólo se muestra alterada tras la inactivación simultánea de un mínimo de seis sistemas TA (Maisonneuve y col., 2011). Otra posibilidad es que los cinco sistemas TA de *S. Typhimurium* importantes para la supervivencia intracelular (*ta4_{ST}*, *vapBC2_{ST}*, *hok-sok_{ST}*, *ldrA-rdIA_{ST}* y *tisB-istR_{ST}*) contribuyan a un mismo proceso pero a través de diferentes rutas. Cada sistema podría tener una eficacia distinta en la adaptación del metabolismo de la bacteria extracelular a la condición intracelular. Lo que se conoce de estos sistemas es que: la toxina T4_{ST} podría ser una N-acetil transferasa; VapC2_{ST} una RNasa específica de secuencia; y las toxinas Hok_{ST}, LdrA_{ST} y TisB_{ST} péptidos hidrofóbicos que podrían alterar el potencial de membrana y/o tener algún efecto regulador adicional. Aún teniendo todas las toxinas dianas celulares distintas, todas ellas podrían encontrarse potencialmente en una misma cascada de regulación en la célula.

Modelo de participación de los sistemas TA de S. Typhimurium en la adaptación a la vida intracelular.

En base al conjunto de datos obtenidos durante la realización de esta Tesis Doctoral y la bibliografía consultada, se ha propuesto un modelo para explicar la contribución de los sistemas TA en el proceso adaptativo que lleva a cabo *S. Typhimurium* cuando coloniza la célula eucariota. El contacto de la bacteria con la célula eucariota permite la inyección de diversos efectores, codificados en la SPI-1, necesarios para la invasión. En este punto, se podría especular sobre una activación temprana de los sistemas TA como mecanismo para adaptar el metabolismo de la bacteria al entorno que se encontrará intracelularmente. Una vez en el interior de célula eucariota, *S. Typhimurium* se encuentra en el interior de una vacuola en el interrumpe el mecanismo que marca la SCV para su fusión con lisosomas, activando un amplio set de genes codificados en las islas de patogenicidad principalmente de la SPI-2. En el interior de la SCV las condiciones de bajo pH, estrés oxidativo (más o menos importante dependiendo del tipo celular) y la presencia de péptidos antimicrobianos entre otros, supondría una situación de estrés que activaría proteasas como Lon o Clp y ARNasas como ARNasa III, capaces de activar la transcripción y traducción de los sistemas TA tipo I y II. La acción coordinada de ambos tipos de sistemas TA podría garantizar un reajuste del metabolismo de la bacteria. Este proceso, al igual que en lo descrito en la formación de células persistentes, podría inducir quiescencia en la bacteria. Este efecto, además de reducir el catabolismo en la bacteria intracelular, podría servir como vía para evitar una activación desmesurada del sistema inmune del

DISCUSIÓN

hospedador. Hay que considerar además que la bacteria dirige activamente la SCV a una localización perinuclear en estrecho contacto con el aparato de Golgi donde tiene acceso directo al tráfico vesicular y fuentes de nutrientes de la célula. Durante este tráfico, así como en el mantenimiento posterior de la bacteria en el interior de la SCV, los sistemas TA tipo I y sus pequeñas toxinas hidrofóbicas (secretadas directamente, o mediante de vesículas) podrían jugar un papel en la biogénesis no convencional de este compartimento, caracterizada principalmente por el bloqueo de la fusión con lisosomas.

Identificar la verdadera implicación de estos sistemas en la vida intracelular conllevará necesariamente la caracterización funcional e identificación de la diana celular de las toxinas así como la cinética de activación de los sistemas TA aquí descritos.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

El trabajo experimental llevado a cabo durante la realización de esta Tesis Doctoral dio lugar a las siguientes conclusiones:

1. La estirpe SL1344 de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium codifica en su genoma 27 posibles sistemas toxina-antitoxina (TA), de los cuales 23 son cromosómicos y cuatro plasmídicos: dos en el plásmido de virulencia pSLT y dos en el plásmido pCol1B9. Sólo se detectaron sistemas TA pertenecientes a los tipos I y II.
2. Los ensayos de toxicidad y neutralización demostraron que sólo 18 de los 27 posibles sistemas TA que posee *S. Typhimurium* SL1344 son funcionales tomando como criterio el descenso de cultivabilidad de la bacteria. Dentro de los nueve sistemas TA negativos, en dos de ellos (*relBE3_{ST}* y *ta1_{ST}*) la antitoxina mostró no ser funcional, mientras que en los otros siete (*ccdAB_{ST}*, *higBA_{ST}*, *ibsB-sibB_{ST}*, *pasTl_{ST}*, *symER_{ST}*, *ta3_{ST}* y *vapBC_{ST}*) el componente no funcional fue la toxina.
3. *S. Typhimurium*, y otros serovares patógenos pertenecientes a la subespecie I (*enterica*) de la especie *S. enterica* tienen un mayor número de sistemas TA que la especie no patógena *S. bongori*. Esta diferencia podría estar relacionada con la capacidad de infectar organismos endotermos de estos serovares patógenos.
4. *S. Typhimurium* SL1344 produce componentes de sistemas TA cuando coloniza el interior de fibroblastos y células epiteliales.
5. En el modelo de fibroblastos, *S. Typhimurium* intracelular aumenta la producción de las toxinas T2_{ST}, T4_{ST}, T5_{ST} y VapC2_{ST} pertenecientes a sistemas TA tipo II, y las toxinas Hok_{ST}, LdrA_{ST} and TisB_{ST} pertenecientes a sistemas TA tipo I.
6. En células epiteliales, en las que la bacteria intracelular prolifera activamente, *S. Typhimurium* sólo aumenta la expresión de la toxina VapC2_{ST}. Las otras tres toxinas, T2_{ST}, T4_{ST} y T5_{ST}, presentan unos niveles intracelulares relativos similares a los de la bacteria extracelular.
7. *S. Typhimurium* emplea al menos cinco sistemas TA para mantener la viabilidad en el interior de fibroblastos. Estos son: *hok-sok_{ST}*, *ldrA-rdIA_{ST}*, *tisB-istR_{ST}*, *ta4_{ST}* y *vapBC2_{ST}*. Por el contrario, sólo el sistema *vapBC2_{ST}* ejerce un papel similar en bacteria intracelular que prolifera en el interior de células epiteliales HeLa.

CONCLUSIONS

The experimental work performed during this Doctoral Thesis has led the following conclusions:

1. The strain SL1344 of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium encodes in its genome a total of 27 putative toxin-antitoxin modules. Of these, 23 are chromosomal and 4 plasmidic, with two encoded in the virulence plasmid pSLT and the other two in plasmid pCol1B9.
2. Toxicity and neutralization analysis demonstrated that only 18 out of 27 *S. Typhimurium* SL1344 putative TA modules are *bona fide* systems. Among the nine non-functional systems in two of them (*relBE3_{ST}* and *ta1_{ST}*) the antitoxin was non-functional. In the other seven (*ccdAB_{ST}*, *higBA_{ST}*, *ibsB-sibB_{ST}*, *pasT_{ST}*, *symER_{ST}*, *ta3_{ST}* and *vapBC_{ST}*) the toxin did not show a clear toxic activity.
3. *S. Typhimurium* SL1344 and other pathogenic serovars belonging to subspecies I (*enterica*) of *S. enterica* presented higher numbers of TA modules than the non-pathogenic species *S. bongori*. These observations argue for the possible implication in the infection of endothermic hosts by these serovars.
4. *S. Typhimurium* SL1344 produces type I and type II TA modules inside fibroblasts and epithelial cells.
5. In fibroblasts, *S. Typhimurium* SL1344 up-regulates the production of T2_{ST}, T4_{ST}, T5_{ST} and VapC2_{ST} of type II modules and toxins Hok_{ST}, LdrA_{ST} and TisB_{ST} of type I modules.
6. In epithelial cells, in which *S. Typhimurium* SL1344 proliferates actively, intracellular bacteria only induce the expression of VapC2_{ST}. The other three toxins, T2_{ST}, T4_{ST} and T5_{ST}, exhibit intracellular levels equal to those observed in extracellular bacteria.
7. *S. Typhimurium* uses at least five TA modules to survive inside fibroblasts. These are *hok-sok_{ST}*, *ldrA-rdIA_{ST}*, *tisB-istR_{ST}*, *ta4_{ST}* and *vapBC2_{ST}*. By contrast, only *vapBC2_{ST}*, affects fitness of intracellular bacteria following infection of epithelial cells.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre-Ramírez, M., Ramírez-Santos, J., Van Melderen L. y Gomez-Eichelmann, M.C. (2006) Expression of the F plasmid ccd toxin-antitoxin system in *Escherichia coli* cells under nutritional stress. *Can J Microbiol* **52**: 24-30.
- Ahidjo, B.A., Kuhnert, D., McKenzie, J.L., Machowski, E.E., Gordhan, B.G., Arcus, V., Abrahams G.L. y Mizrahi, V. (2011) VapC toxins from *Mycobacterium tuberculosis* are ribonucleases that differentially inhibit growth and are neutralized by cognate VapB antitoxins. *PLoS One* **6**: e21738.
- Aiastui, A., Pucciarelli M.G. y García-del Portillo, F. (2010) *Salmonella enterica* serovar typhimurium invades fibroblasts by multiple routes differing from the entry into epithelial cells. *Infect Immun* **78**: 2700-2713.
- Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H. y Glaser, G. (1996) An *Escherichia coli* chromosomal "addiction module" regulated by guanosine [corrected] 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 6059-6063.
- Alix, E. y Blanc-Potard, A.B. (2008) Peptide-assisted degradation of the *Salmonella* MgtC virulence factor. *EMBO J* **27**: 546-557.
- Alix, E. y A.B. Blanc-Potard, (2009) Hydrophobic peptides: novel regulators within bacterial membrane. *Mol Microbiol* **72**: 5-11.
- Allen, G.C., Jr. y Kornberg, A. (1991) Fine balance in the regulation of DnaB helicase by DnaC protein in replication in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **266**: 22096-22101.
- Arcus, V.L., Backbro, K., Roos, A., Daniel E.L. y Baker, E.N. (2004) Distant structural homology leads to the functional characterization of an archaeal PIN domain as an exonuclease. *J Biol Chem* **279**: 16471-16478.
- Bahassi, E.M., Salmon, M.A., Van Melderen, L., Bernard P. y Couturier, M. (1995) F plasmid CcdB killer protein: ccdB gene mutants coding for non-cytotoxic proteins which retain their regulatory functions. *Mol Microbiol* **15**: 1031-1037.
- Baker, T.A. y Sauer, R.T. (2006) ATP-dependent proteases of bacteria: recognition logic and operating principles. *Trends Biochem Sci* **31**: 647-653.
- Bäumler, A.J. (1997) The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*. *Trends Microbiol* **5**: 318-322.
- Bäumler, A.J., Tsolis, R.M., Bowe, F.A., Kusters, J.G., Hoffmann S. y Heffron, F. (1996) The pef fimbrial operon of *Salmonella typhimurium* mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. *Infect Immun* **64**: 61-68.
- Bäumler, A.J., S.E. Winter, P. Thiennimitr y J. Casadesús, (2011) Intestinal and chronic infections: *Salmonella* lifestyles in hostile environments. *Environ Microbiol Rep* **3**: 508-517.
- Bemis, D.A., Grupka, L.M., Liamthong, S., Folland, D.W., Sykes J.M.t. y Ramsay, E.C. (2007) Clonal relatedness of *Salmonella* isolates associated with invasive infections in captive and wild-caught rattlesnakes. *Vet Microbiol* **120**: 300-307.
- Berends, B.R., Urlings, H.A., Snijders J.M. y Van Knapen, F. (1996) Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. *Int J Food Microbiol* **30**: 37-53.
- Bernal-Bayard, J., Cardenal-Muñoz E. y Ramos-Morales, F. (2010) The *Salmonella* type III secretion effector, salmonella leucine-rich repeat protein (SlrP), targets the human chaperone ERdj3. *J Biol Chem* **285**: 16360-16368.
- Bernal-Bayard, J. y Ramos-Morales, F. (2009) *Salmonella* type III secretion effector SlrP is an E3 ubiquitin ligase for mammalian thioredoxin. *J Biol Chem* **284**: 27587-27595.
- Bernard, P. y Couturier, M. (1992) Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *Journal of Molecular Biology* **226**: 735-745.
- Bigger, J. (1944) TREATMENT OF STAPHYLOCOCCAL INFECTIONS WITH PENICILLIN BY INTERMITTENT STERILISATION. *The Lancet* **244**: 497-500.

- Birmingham, C.L., Jiang, X., Ohlson, M.B., Miller, S.I. y Brumell, J.H. (2005) Salmonella-induced filament formation is a dynamic phenotype induced by rapidly replicating Salmonella enterica serovar typhimurium in epithelial cells. *Infect Immun* **73**: 1204-1208.
- Blanc-Potard, A.B. y Groisman, E.A. (1997) The Salmonella selC locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO J* **16**: 5376-5385.
- Blanc-Potard, A.B., Solomon, F., Kayser, J. y Groisman, E.A. (1999) The SPI-3 pathogenicity island of Salmonella enterica. *J Bacteriol* **181**: 998-1004.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B. y Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Science* **277**: 10.
- Blower, T.R., Short, F.L., Rao, F., Mizuguchi, K., Pei, X.Y., Fineran, P.C., Luisi, B.F. y Salmond, G.P. (2012) Identification and classification of bacterial Type III toxin-antitoxin systems encoded in chromosomal and plasmid genomes. *Nucleic Acids Res* **40**: 6158-6173.
- Bobrovskyy, M. y Vanderpool, C.K. (2014) The small RNA SgrS: roles in metabolism and pathogenesis of enteric bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* **4**: 61.
- Bordes, P., Cirinesi, A.M., Ummels, R., Sala, A., Sakr, S., Bitter, W. y Genevaux, P. (2011) SecB-like chaperone controls a toxin-antitoxin stress-responsive system in Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 8438-8443.
- Boyle, E.C., Bishop, J.L., Grassl, G.A. y Finlay, B.B. (2007) Salmonella: from pathogenesis to therapeutics. *J Bacteriol* **189**: 1489-1495.
- Braden, C.R. (2006) Salmonella enterica serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States. *Clin Infect Dis* **43**: 512-517.
- Brantl, S. (2012) Bacterial type I toxin-antitoxin systems. *RNA Biol* **9**: 1488-1490.
- Bravo, A., de Torrontegui, G. y Diaz, R. (1987) Identification of components of a new stability system of plasmid R1, ParD, that is close to the origin of replication of this plasmid. *Mol Gen Genet* **210**: 101-110.
- Brennan, M.A. y Cookson, B.T. (2000) Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol Microbiol* **38**: 31-40.
- Bunker, R.D., McKenzie, J.L., Baker, E.N. y Arcus, V.L. (2008) Crystal structure of PAE0151 from Pyrobaculum aerophilum, a PIN-domain (VapC) protein from a toxin-antitoxin operon. *Proteins* **72**: 510-518.
- Buts, L., Lah, J., Dao-Thi, M.H., Wyns, L. y Loris, R. (2005) Toxin-antitoxin modules as bacterial metabolic stress managers. *Trends Biochem Sci* **30**: 672-679.
- Calderón, P.F., Morales, E.H., Acuna, L.G., Fuentes, D.N., Gil, F., Porwollik, S., McClelland, M., Saavedra, C.P. y Calderon, I.L. (2014) The small RNA RyhB homologs from Salmonella typhimurium participate in the response to S-nitrosoglutathione-induced stress. *Biochem Biophys Res Commun* **450**: 641-645.
- Callaway, T.R., Edrington, T.S., Anderson, R.C., Byrd, J.A. y Nisbet, D.J. (2008) Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to Salmonella. *J Anim Sci* **86**: E163-172.
- Cano, D.A., Martínez-Moya, M., Pucciarelli, M.G., Groisman, E.A., Casadesus, J. y García-del Portillo, F. (2001) Salmonella enterica serovar Typhimurium response involved in attenuation of pathogen intracellular proliferation. *Infect Immun* **69**: 6463-6474.
- Cano, D.A., Pucciarelli, M.G., Martínez-Moya, M., Casadesús, J. y García-del Portillo, F. (2003) Selection of small-colony variants of Salmonella enterica serovar typhimurium in nonphagocytic eucaryotic cells. *Infect Immun* **71**: 3690-3698.
- Carnell, S.C., Bowen, A., Morgan, E., Maskell, D.J., Wallis, T.S. y Stevens, M.P. (2007) Role in virulence and protective efficacy in pigs of Salmonella enterica serovar Typhimurium secreted components identified by signature-tagged mutagenesis. *Microbiology* **153**: 1940-1952.

- Cataudella, I., Trusina, A., Sneppen, K., Gerdes, K. y Mitarai, N. (2012) Conditional cooperativity in toxin-antitoxin regulation prevents random toxin activation and promotes fast translational recovery. *Nucleic Acids Res* **40**: 6424-6434.
- CDC, C.f.D.C.a.P., (2013) An Atlas of Salmonella in the United States, 1968-2011: Laboratory-based Enteric Disease Surveillance. **2013**.
- Clissold, P.M. y Ponting, C.P. (2000) PIN domains in nonsense-mediated mRNA decay and RNAi. *Curr Biol* **10**: R888-890.
- Coburn, B., Grassl, G.A. y Finlay, B.B. (2007) Salmonella, the host and disease: a brief review. *Immunol Cell Biol* **85**: 112-118.
- Crawford, R.W., Rosales-Reyes, R., Ramírez-Aguilar Mde. L., Chapa-Azuela, O., Alpuche-Aranda, C. y Gunn, J.S. (2010) Gallstones play a significant role in Salmonella spp. gallbladder colonization and carriage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 4353-4358.
- Creagh, E.M., Conroy, H. y Martín, S.J. (2003) Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol Rev* **193**: 10-21.
- Cutting, S., Anderson, M., Lysenko, E., Page, A., Tomoyasu, T., Tatematsu, K., Tatsuta, T., Kroos, L. y Ogura, T. (1997) SpoVM, a small protein essential to development in *Bacillus subtilis*, interacts with the ATP-dependent protease FtsH. *J Bacteriol* **179**: 5534-5542.
- Chan, R.K., Botstein, D., Watanabe, T. y 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.
- Chang, A.C. y Cohen, S.N. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *Journal of bacteriology* **134**: 1141-1156.
- Cherepanov, P.P. y 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.
- Christensen-Dalsgaard, M., Jorgensen, M.G. y Gerdes, K. (2010) Three new RelE-homologous mRNA interferases of *Escherichia coli* differentially induced by environmental stresses. *Molecular microbiology* **75**: 333-348.
- Christensen, S.K., Mikkelsen, M., Pedersen, K. y Gerdes, K. (2001) RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 14328-14333.
- Chung, Y.C., Kim, Y.S., Shadchehr, A., Garrido, A., Macgregor, I.L. y Sleisenger, M.H. (1979) Protein digestion and absorption in human small intestine. *Gastroenterology* **76**: 1415-1421.
- Daines, D.A., Wu, M.H. y Yuan, S.Y. (2007) VapC-1 of nontypeable *Haemophilus influenzae* is a ribonuclease. *J Bacteriol* **189**: 5041-5048.
- Dao-Thi, M.H., Van Melderren, L., De Genst, E., Afif, H., Buts, L., Wyns, L. y Loris, R. (2005) Molecular basis of gyrase poisoning by the addiction toxin CcdB. In: *J Mol Biol.* pp. 1091-1102.
- Datsenko, K.A. y Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6640-6645.
- De la Cruz, M.A., Zhao, W., Farenc, C., Giménez, G., Raoult, D., Cambillau, C., Gorvel, J.P. y Meresse, S. (2013) A toxin-antitoxin module of *Salmonella* promotes virulence in mice. *PLoS Pathog* **9**: e1003827.
- Deiwick, J., Salcedo, S.P., Boucrot, E., Gilliland, S.M., Henry, T., Petermann, N., Waterman, S.R., Gorvel, J.P., Holden, D.W. y Meresse, S. (2006) The translocated *Salmonella* effector proteins SseF and SseG interact and are required to establish an intracellular replication niche. *Infect Immun* **74**: 6965-6972.
- Demidenok, O.I., Kaprelyants, A.S. y Goncharenko, A.V. (2014) Toxin-antitoxin vapBC locus participates in formation of the dormant state in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol Lett* **352**: 69-77.

- Domínguez-Bernal, G., Pucciarelli, M.G., Ramos-Morales, F., García-Quintanilla, M., Cano, D.A., Casadesús, J. y García-del Portillo, F. (2004) Repression of the RcsC-YojN-RcsB phosphorelay by the IgaA protein is a requisite for Salmonella virulence. *Mol Microbiol* **53**: 1437-1449.
- Donegan, N.P. y Cheung, A.L. (2009) Regulation of the mazEF toxin-antitoxin module in Staphylococcus aureus and its impact on sigB expression. *Journal of bacteriology* **191**: 2795-2805.
- Doolittle, R.F., Feng, D.F., Tsang, S., Cho, G. y Little, E. (1996) Determining divergence times of the major kingdoms of living organisms with a protein clock. *Science* **271**: 470-477.
- Dorr, T., Vulic, M. y Lewis, K. (2010) Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in Escherichia coli. *PLoS biology* **8**: e1000317.
- Dorsey, C.W., Laarakker, M.C., Humphries, A.D., Weening, E.H. y Bäumlér, A.J. (2005) Salmonella enterica serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. *Mol Microbiol* **57**: 196-211.
- Dower, W.J., Miller, J.F. y Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**: 6127-6145.
- Eddy, S.R. (2004) Where did the BLOSUM62 alignment score matrix come from? *Nat Biotechnol* **22**: 1035-1036.
- Eguchi, Y., Itou, J., Yamane, M., Demizu, R., Yamato, F., Okada, A., Mori, H., Kato, A. y Utsumi, R. (2007) B1500, a small membrane protein, connects the two-component systems EvgS/EvgA and PhoQ/PhoP in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 18712-18717.
- Eijkelkamp, B.A., Stroehér, U.H., Hassan, K.A., Paulsen, I.T. y Brown, M.H. (2014) Comparative analysis of surface-exposed virulence factors of Acinetobacter baumannii. *BMC Genomics* **15**: 1020.
- Engelberg-Kulka, H., Amitai, S., Kolodkin-Gal, I. y Hazan, R. (2006) Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. *PLoS Genet* **2**: e135.
- Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M. y Hinton, J.C. (2003) Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular Salmonella enterica. *Mol Microbiol* **47**: 103-118.
- Fábrega, A. y Vila, J. (2013) Salmonella enterica serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin Microbiol Rev* **26**: 308-341.
- Fantuzzi, G. y Dinarello, C.A. (1999) Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *J Clin Immunol* **19**: 1-11.
- Figueira, R. y Holden, D.W. (2012) Functions of the Salmonella pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors. *Microbiology* **158**: 1147-1161.
- Fineran, P.C., Blower, T.R., Foulds, I.J., Humphreys, D.P., Lilley, K.S. y Salmond, G.P. (2009) The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 894-899.
- Fink, S.L. y Cookson, B.T. (2007) Pyroptosis and host cell death responses during Salmonella infection. *Cell Microbiol* **9**: 2562-2570.
- Finlay, B.B. y 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.
- Fookes, M., Schroeder, G.N., Langridge, G.C., Blondel, C.J., Mammina, C., Connor, T.R., Seth-Smith, H., Vernikos, G.S., Robinson, K.S., Sanders, M., Petty, N.K., Kingsley, R.A., Bäumlér, A.J., Nuccio, S.P., Contreras, I., Santiviago, C.A., Maskell, D., Barrow, P., Humphrey, T., Nastasi, A., Roberts, M., Frankel, G., Parkhill, J., Dougan, G. y Thomson, N.R. (2011) Salmonella bongori provides insights into the evolution of the Salmonellae. *PLoS Pathog* **7**: e1002191.
- Foster, J.W. y Hall, H.K. (1991) Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of Salmonella typhimurium. *J Bacteriol* **173**: 5129-5135.
- Fozo, E.M., Hemm, M.R. y Storz, G. (2008a) Small toxic proteins and the antisense RNAs that repress them. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**: 579-589, Table of Contents.

- Fozo, E.M., Kawano, M., Fontaine, F., Kaya, Y., Mendieta, K.S., Jones, K.L., Ocampo, A., Rudd, K.E. y Storz, G. (2008b) Repression of small toxic protein synthesis by the Sib and OhsC small RNAs. *Mol Microbiol* **70**: 1076-1093.
- Fozo, E.M., Makarova, K.S., Shabalina, S.A., Yutin, N., Koonin, E.V. y Storz, G. (2010) Abundance of type I toxin-antitoxin systems in bacteria: searches for new candidates and discovery of novel families. *Nucleic Acids Res.*
- Franch, T., Thisted, T. y Gerdes, K. (1999) Ribonuclease III processing of coaxially stacked RNA helices. *J Biol Chem* **274**: 26572-26578.
- Galán, J.E. y Collmer, A. (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**: 1322-1328.
- Ganz, T. (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* **3**: 710-720.
- Garai, P., Gnanadhas, D.P. y Chakravorty, D. (2012) Salmonella enterica serovars Typhimurium and Typhi as model organisms: revealing paradigm of host-pathogen interactions. *Virulence* **3**: 377-388.
- García-Calderón, C.B., Casadesús, J. y Ramos-Morales, F. (2007) Rcs and PhoPQ regulatory overlap in the control of Salmonella enterica virulence. *J Bacteriol* **189**: 6635-6644.
- García-del Portillo, F. (2001) Salmonella intracellular proliferation: where, when and how? *Microbes Infect* **3**: 1305-1311.
- García-del Portillo, F. y Finlay, B.B. (1994) Invasion and intracellular proliferation of Salmonella within non-phagocytic cells. *Microbiologia* **10**: 229-238.
- García-del Portillo, F. y Finlay, B.B. (1995) Targeting of Salmonella typhimurium to vesicles containing lysosomal membrane glycoproteins bypasses compartments with mannose 6-phosphate receptors. *J Cell Biol* **129**: 81-97.
- García-del Portillo, F., Stein, M.A. y Finlay, B.B. (1997) Release of lipopolysaccharide from intracellular compartments containing Salmonella typhimurium to vesicles of the host epithelial cell. *Infect Immun* **65**: 24-34.
- García-del Portillo, F., Zwick, M.B., Leung, K.Y. y Finlay, B.B. (1993a) Intracellular replication of Salmonella within epithelial cells is associated with filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins. *Infect Agents Dis* **2**: 227-231.
- García-del Portillo, F., Zwick, M.B., Leung, K.Y. y Finlay, B.B. (1993b) Salmonella induces the formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 10544-10548.
- García-Quintanilla, M., Prieto, A.I., Barnes, L., Ramos-Morales, F. y Casadesús, J. (2006) Bile-induced curing of the virulence plasmid in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **188**: 7963-7965.
- Georgiades, K. y Raoult, D. (2011) Genomes of the most dangerous epidemic bacteria have a virulence repertoire characterized by fewer genes but more toxin-antitoxin modules. *PLoS One* **6**: e17962.
- Gerdes, K. (2013) *Prokaryotic toxin-antitoxins*. Springer, Heidelberg, Berlin.
- Gerdes, K., S.K. Christensen y A. Lobner-Olesen, (2005) Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol* **3**: 371-382.
- Gerdes, K., Nielsen, A., Thorsted, P. y Wagner, E.G. (1992) Mechanism of killer gene activation. Antisense RNA-dependent RNase III cleavage ensures rapid turn-over of the stable hok, srnB and pndA effector messenger RNAs. *J Mol Biol* **226**: 637-649.
- Gerdes, K., Rasmussen, P.B. y Molin, S. (1986) Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 3116-3120.
- Gerlach, R.G., Jackel, D., Stecher, B., Wagner, C., Lupas, A., Hardt, W.D. y Hensel, M. (2007) Salmonella Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system. *Cell Microbiol* **9**: 1834-1850.
- Giammanco, G.M., Pignato, S., Mammina, C., Grimont, F., Grimont, P.A., Nastasi, A. y Giammanco, G. (2002) Persistent endemicity of Salmonella bongori 48:z(35):--in Southern Italy: molecular

- characterization of human, animal, and environmental isolates. *J Clin Microbiol* **40**: 3502-3505.
- González-Escobedo, G. y Gunn, J.S. (2013) Identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genes regulated during biofilm formation on cholesterol gallstone surfaces. *Infect Immun* **81**: 3770-3780.
- Gotfredsen, M. y Gerdes, K. (1998) The *Escherichia coli* relBE genes belong to a new toxin-antitoxin gene family. *Molecular Microbiology* **29**: 1065-1076.
- Grimont, P. y Weill, F. (2007) Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9th edition. *World Health Organization Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella. Pasteur Institute, Paris, France.*
- Guiney, D.G. (2005) The role of host cell death in *Salmonella* infections. *Curr Top Microbiol Immunol* **289**: 131-150.
- Guo, Y., Quiroga, C., Chen, Q., McAnulty, M.J., Benedik, M.J., Wood, T.K. y Wang, X. (2014) RalR (a DNase) and RalA (a small RNA) form a type I toxin-antitoxin system in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*; **42**: 6448-6462.
- Hallez, R., Geeraerts, D., Sterckx, Y., Mine, N., Loris, R. y Van Melderen, L. (2010) New toxins homologous to ParE belonging to three-component toxin-antitoxin systems in *Escherichia coli* O157:H7. *Molecular microbiology* **76**: 719-732.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Haneda, T., Ishii, Y., Shimizu, H., Ohshima, K., Iida, N., Danbara, H. y Okada, N. (2012) *Salmonella* type III effector SpvC, a phosphothreonine lyase, contributes to reduction in inflammatory response during intestinal phase of infection. *Cell Microbiol* **14**: 485-499.
- Hansen-Wester, I., Chakravorty, D. y Hensel, M. (2004) Functional transfer of *Salmonella* pathogenicity island 2 to *Salmonella bongori* and *Escherichia coli*. *Infect Immun* **72**: 2879-2888.
- Harmer, C.J., Holt, K.E. y Hall, R.M. (2014) A type 2 A/C2 plasmid carrying the aacC4 apramycin resistance gene and the erm(42) erythromycin resistance gene recovered from two *Salmonella enterica* serovars. *J Antimicrob Chemother.*
- Hautefort, I., Thompson, A., Eriksson-Ygberg, S., Parker, M.L., Lucchini, S., Danino, V., Bongaerts, R.J., Ahmad, N., Rhen, M. y Hinton, J.C. (2008) During infection of epithelial cells *Salmonella enterica* serovar Typhimurium undergoes a time-dependent transcriptional adaptation that results in simultaneous expression of three type 3 secretion systems. *Cell Microbiol* **10**: 958-984.
- Hayes, F. (2003) Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science* **301**: 1496-1499.
- Hazan, R. y Engelberg-Kulka, H. (2004) *Escherichia coli* mazEF-mediated cell death as a defense mechanism that inhibits the spread of phage P1. *Mol Genet Genomics* **272**: 227-234.
- Helaine, S., Cheverton A.M., Watson, K.G., Faure, L.M., Matthews, S.A. y Holden, D.W. (2014) Internalization of *Salmonella* by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. *Science* **343**: 204-208.
- Hendriksen, R.S., Leekitcharoenphon, P., Lukjancenko, O., Lukwesa-Musyani, C., Tambatamba, B., Mwaba, J., Kalonda, A., Nakazwe, R., Kwenda, G., Jensen, J.D., Svendsen, C.A., Dittmann, K.K., Kaas, R.S., Cavaco, L.M., Aarestrup, F.M., Hasman, H. y Mwansa, J.C. (2014) Genomic Signature of Multi-Drug Resistant *Salmonella* Typhi related to a Massive Outbreak in Zambia during 2010 - 2012. *J Clin Microbiol.*
- Henikoff, S. y Henikoff, J.G. (1992) Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 10915-10919.
- Hernández, L.D., Hueffer, K., Wenk, M.R. y Galán, J.E. (2004) *Salmonella* modulates vesicular traffic by altering phosphoinositide metabolism. *Science* **304**: 1805-1807.

- Herrero-Fresno, A., Leekitcharoenphon, P., Hendriksen, R.S., Olsen, J.E. y Aarestrup, F.M. (2014). Analysis of the contribution of bacteriophage ST64B to in vitro virulence traits of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Med Microbiol* **63**: 331-342.
- Herrero, A., Mendoza, M.C., Rodicio, R. y Rodicio, M.R. (2008) Characterization of pUO-StVR2, a virulence-resistance plasmid evolved from the pSLT virulence plasmid of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 4514-4517.
- Hersh, D., Monack, D.M., Smith, M.R., Ghori, N., Falkow, S. y Zychlinsky, A. (1999) The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 2396-2401.
- Hoise, S.K. y Stocker, B.A. (1981) Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* **291**: 238-239.
- Hong, K.H. y Miller, V.L. (1998) Identification of a novel *Salmonella* invasion locus homologous to *Shigella* ipgDE. *J Bacteriol* **180**: 1793-1802.
- Hopper, S., Wilbur, J.S., Vasquez, B.L., Larson, J., Clary, S., Mehr, I.J., Seifert, H.S. y So, M. (2000) Isolation of *Neisseria gonorrhoeae* mutants that show enhanced trafficking across polarized T84 epithelial monolayers. *Infect Immun* **68**: 896-905.
- Hu, Y., Benedik M.J., y Wood, T.K. (2012) Antitoxin DinJ influences the general stress response through transcript stabilizer CspE. *Environ Microbiol* **14**: 669-679.
- Ito, K. y Akiyama, Y. (2005) Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. *Annu Rev Microbiol* **59**: 211-231.
- Jaffe, A., Ogura, T. y Hiraga, S. (1985) Effects of the ccd function of the F plasmid on bacterial growth. *Journal of Bacteriology* **163**: 841-849.
- Jones, B.D., Ghori, N. y Falkow, S. (1994) *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* **180**: 15-23.
- Kall, L., Canterbury, J.D., Weston, J., Noble, W.S. y MacCoss, M.J. (2007) Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nat Methods* **4**: 923-925.
- Kaspy, I., Rotem, E., Weiss, N., Ronin, I., Balaban, N.Q. y Glaser, G. (2013) HipA-mediated antibiotic persistence via phosphorylation of the glutamyl-tRNA-synthetase. *Nat Commun* **4**: 3001.
- Kawano, M., Aravind, L. y Storz, G. (2007) An antisense RNA controls synthesis of an SOS-induced toxin evolved from an antitoxin. *Molecular microbiology* **64**: 738-754.
- Kawano, M., Oshima, T., Kasai, H. y Mori, H. (2002) Molecular characterization of long direct repeat (LDR) sequences expressing a stable mRNA encoding for a 35-amino-acid cell-killing peptide and a cis-encoded small antisense RNA in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **45**: 333-349.
- Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N. y Lewis, K. (2004) Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **186**: 8172-8180.
- Ketterer, M.R., Shao, J.Q., Hornick, D.B., Buscher, B., Bandi, V.K. y Apicella, M.A. (1999) Infection of primary human bronchial epithelial cells by *Haemophilus influenzae*: macropinocytosis as a mechanism of airway epithelial cell entry. *Infect Immun* **67**: 4161-4170.
- Kim, Y., Wang, X., Ma, Q., Zhang, X.S. y Wood, T.K. (2009) Toxin-antitoxin systems in *Escherichia coli* influence biofilm formation through YjgK (TabA) and fimbriae. *Journal of bacteriology* **191**: 1258-1267.
- Kim, Y., Wang, X., Zhang, X.S., Grigoriu, S., Page, R., Peti, W. y Wood, T.K. (2010) *Escherichia coli* toxin/antitoxin pair MqsR/MqsA regulate toxin CspD. *Environmental microbiology* **12**: 1105-1121.
- Kingsley, R.A. y Bäumler, A.J. (2000) Host adaptation and the emergence of infectious disease: the *Salmonella* paradigm. *Mol Microbiol* **36**: 1006-1014.
- Kingsley, R.A., Kay, S., Connor, T., Barquist, L., Sait, L., Holt, K.E., Sivaraman, K., Wileman, T., Goulding, D., Clare, S., Hale, C., Seshasayee, A., Harris, S., Thomson, N.R., Gardner, P., Rabsch, W., Wigley, P., Humphrey, T., Parkhill, J. y Dougan, G. (2013) Genome and transcriptome

- adaptation accompanying emergence of the definitive type 2 host-restricted *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathovar. *MBio* **4**: e00565-00513.
- Klumpp, J. y Fuchs, T.M. (2007) Identification of novel genes in genomic islands that contribute to *Salmonella typhimurium* replication in macrophages. *Microbiology* **153**: 1207-1220.
- Knodler, L.A., Finlay, B.B. y Steele-Mortimer, O. (2005) The *Salmonella* effector protein SopB protects epithelial cells from apoptosis by sustained activation of Akt. *J Biol Chem* **280**: 9058-9064.
- Komi, K.K., Y. Ge, M., Xin, X.Y., Ojcius, D.M., Sun, D., Hu, W.L., Zhao, X., Lin, X. y Yan, J. (2014) ChpK and MazF of the toxin-antitoxin modules are involved in the virulence of *Leptospira interrogans* during infection. *Microbes Infect.*
- Kubasova, T., Matiasovicova, J., Rychlik, I. y Juricova, H. (2014) Complete sequence of multidrug resistance p9134 plasmid and its variants including natural recombinant with the virulence plasmid of *Salmonella* serovar Typhimurium. *Plasmid* **76C**: 8-14.
- Kuhle, V. y Hensel, M. (2004) Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *Cell Mol Life Sci* **61**: 2812-2826.
- Kumar, S. (2005) Molecular clocks: four decades of evolution. *Nat Rev Genet* **6**: 654-662.
- Kwan, B.W., Lord, D.M., Peti, W., Page, R., Benedik, M.J. y Wood, T.K. (2014) The MqsR/MqsA Toxin/Antitoxin System Protects *Escherichia coli* During Bile Acid Stress. *Environ Microbiol.*
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., López, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. y Higgins, D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948.
- Latasa, C., García, B., Echeverz, M., Toledo-Arana, A., Valle, J., Campoy, S., García-del Portillo, F., Solano C. y Lasa, I. (2012) *Salmonella* biofilm development depends on the phosphorylation status of RcsB. *J Bacteriol* **194**: 3708-3722.
- Ledeboer, N.A., Frye, J.G., McClelland, M. y Jones, B.D. (2006) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium requires the Lpf, Pef, and Tafi fimbriae for biofilm formation on HEp-2 tissue culture cells and chicken intestinal epithelium. *Infect Immun* **74**: 3156-3169.
- Lederberg, E.M. y Cohen, S.N. (1974) Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* **119**: 1072-1074.
- Leekitcharoenphon, P., Nielsen, E.M., Kaas, R.S., Lund, O. y Aarestrup, F.M. (2014) Evaluation of whole genome sequencing for outbreak detection of *Salmonella enterica*. *PLoS One* **9**: e87991.
- Lehnherr, H., Maguin, E., Jafri, S. y Yarmolinsky, M.B. (1993) Plasmid addiction genes of bacteriophage P1: doc, which causes cell death on curing of prophage, and phd, which prevents host death when prophage is retained. *J Mol Biol* **233**: 414-428.
- Lemonnier, M. y Lane, D. (1998) Expression of the second lysine decarboxylase gene of *Escherichia coli*. *Microbiology* **144 (Pt 3)**: 751-760.
- Lepplae, R., Geeraerts, D., Hallez, R., Guglielmini, J., Dreze, P. y Van Melderen, L. (2011) Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. *Nucleic Acids Res* **39**: 5513-5525.
- Lesnick, M.L., Reiner, N.E., Fierer, J. y Guiney, D.G. (2001) The *Salmonella* spvB virulence gene encodes an enzyme that ADP-ribosylates actin and destabilizes the cytoskeleton of eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **39**: 1464-1470.
- Libby, S.J., Lesnick, M., Hasegawa, P., Weidenhammer, E. y Guiney, D.G. (2000) The *Salmonella* virulence plasmid spv genes are required for cytopathology in human monocyte-derived macrophages. *Cell Microbiol* **2**: 49-58.
- Lipuma, J., Cinege, G., Bodogai, M., Olah, B., Kiers, A., Endre, G., Dupont, L. y Dusha, I. (2014) A vapBC-type toxin-antitoxin module of *Sinorhizobium meliloti* influences symbiotic efficiency and nodule senescence of *Medicago sativa*. *Environ Microbiol.*

- Loströh, C.P. y Lee, C.A. (2001) The Salmonella pathogenicity island-1 type III secretion system. *Microbes Infect* **3**: 1281-1291.
- Maisonneuve, E., Castro-Camargo, M., y Gerdes, K. (2013) (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity. *Cell* **154**: 1140-1150.
- Maisonneuve, E., Shakespeare, L.J., Jorgensen, M.G., y Gerdes, K. (2011) Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 13206-13211.
- Makarova, K.S., Wolf, Y.I. y Koonin, E.V. (2009) Comprehensive comparative-genomic analysis of Type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes. *Biol Direct* **4**: 19.
- Malik-Kale, P., Winfree, S. y 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**: e38732.
- Martínez-Moya, M., de Pedro, M.A., Schwarz, H. y García-del Portillo, F. (1998) Inhibition of Salmonella intracellular proliferation by non-phagocytic eucaryotic cells. *Res Microbiol* **149**: 309-318.
- Masuda, H., Tan, Q., Awano, N., Wu, K.P. y Inouye, M. (2012) YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in Escherichia coli. *Molecular microbiology* **84**: 979-989.
- Mattison, K., Wilbur, J.S., So, M. y Brennan, R.G. (2006) Structure of FitAB from Neisseria gonorrhoeae bound to DNA reveals a tetramer of toxin-antitoxin heterodimers containing pin domains and ribbon-helix-helix motifs. *J Biol Chem* **281**: 37942-37951.
- Mazurkiewicz, P., Thomas, J., Thompson, J.A., Liu, M., Arbibe, L., Sansonetti, P. y Holden, D.W. (2008) SpvC is a Salmonella effector with phosphothreonine lyase activity on host mitogen-activated protein kinases. *Mol Microbiol* **67**: 1371-1383.
- McClelland, M., Florea, L., Sanderson, K., Clifton, S.W., Parkhill, J., Churcher, C., Dougan, G., Wilson, R.K. y Miller, W. (2000) Comparison of the Escherichia coli K-12 genome with sampled genomes of a Klebsiella pneumoniae and three salmonella enterica serovars, Typhimurium, Typhi and Paratyphi. *Nucleic Acids Res* **28**: 4974-4986.
- McClelland, M., Sanderson, K.E., Spieth, J., Clifton, S.W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., Hou, S., Layman, D., Leonard, S., Nguyen, C., Scott, K., Holmes, A., Grewal, N., Mulvaney, E., Ryan, E., Sun, H., Florea, L., Miller, W., Stoneking, T., Nhan, M., Waterston, R. y Wilson, R.K. (2001) Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**: 852-856.
- McGhie, E.J., Brawn, L.C., Hume, P.J., Humphreys, D. y Koronakis, V. (2009) Salmonella takes control: effector-driven manipulation of the host. *Curr Opin Microbiol* **12**: 117-124.
- McKenzie, J.L., Duyvestyn, J.M., Smith, T., Bendak, K., Mackay, J., Cursons, R., Cook, G.M. y Arcus, V.L. (2012a) Determination of ribonuclease sequence-specificity using Pentaproboscids and mass spectrometry. *RNA* **18**: 1267-1278.
- McKenzie, J.L., Robson, J., Berney, M., Smith, T.C., Ruthe, A., Gardner, P.P., Arcus, V.L. y Cook, G.M. (2012b) A VapBC toxin-antitoxin module is a posttranscriptional regulator of metabolic flux in mycobacteria. *J Bacteriol* **194**: 2189-2204.
- McQuiston, J.R., Fields, P.I., Tauxe, R.V. y Logsdon, Jr., J.M. (2008) Do Salmonella carry spare tyres? *Trends Microbiol* **16**: 142-148.
- Meresse, S., Unsworth, K.E., Habermann, A., Griffiths, G., Fang, F., Martínez-Lorenzo, M.J., Waterman, S.R., Gorvel, J.P. y Holden, D.W. (2001) Remodelling of the actin cytoskeleton is essential for replication of intravacuolar Salmonella. *Cell Microbiol* **3**: 567-577.
- Mok, W.W., Patel, N.H. y Li, Y. (2010) Decoding toxicity: deducing the sequence requirements of IbsC, a type I toxin in Escherichia coli. *J Biol Chem* **285**: 41627-41636.
- Monack, D.M., Hersh, D., Ghori, N., Bouley, D., Zychlinsky, A. y Falkow, S. (2000) Salmonella exploits caspase-1 to colonize Peyer's patches in a murine typhoid model. *J Exp Med* **192**: 249-258.

- Morgan, E., Campbell, J.D., Rowe, S.C., Bispham, J., Stevens, M.P., Bowen, A.J., Barrow, P.A., Maskell, D.J. y Wallis, T.S. (2004) Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **54**: 994-1010.
- Muñoz-Gómez, A.J., Lemonnier, M., Santos-Sierra, S., Berzal-Herranz, A. y Díaz-Orejas, R. (2005) RNase/anti-RNase activities of the bacterial parD toxin-antitoxin system. *J Bacteriol* **187**: 3151-3157.
- Murray, M.G. y Thompson, W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* **8**: 4321-4325.
- Mutschler, H., Gebhardt, M., Shoeman, R.L. y Meinhart, A. (2011) A novel mechanism of programmed cell death in bacteria by toxin-antitoxin systems corrupts peptidoglycan synthesis. *PLoS Biol* **9**: e1001033.
- Nariya, H. y Inouye, M. (2008) MazF, an mRNA interferase, mediates programmed cell death during multicellular *Myxococcus* development. *Cell* **132**: 55-66.
- Nastasi, A., Mamma, C., Villafrate, M.R., Massenti, M.F., Scarlata, G. y Diquattro, M. (1988) Multiple typing of strains of *Salmonella enterica* subsp. bongori ser. 48:Z35:- isolated in southern Italy. *Ann Inst Pasteur Microbiol* **139**: 605-612.
- Nieto, C., Pellicer, T., Balsa, D., Christensen, S.K., Gerdes, K. y Espinosa, M. (2006) The chromosomal relBE2 toxin-antitoxin locus of *Streptococcus pneumoniae*: characterization and use of a bioluminescence resonance energy transfer assay to detect toxin-antitoxin interaction. *Mol Microbiol* **59**: 1280-1296.
- Norton, J.P. y Mulvey, M.A. (2012) Toxin-antitoxin systems are important for niche-specific colonization and stress resistance of uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog* **8**: e1002954.
- Nuccio, S.P. y Bäumler, A.J. (2014) Comparative analysis of *Salmonella* genomes identifies a metabolic network for escalating growth in the inflamed gut. *MBio* **5**: e00929-00914.
- Núñez-Hernández, C., Tierrez, A., Ortega, A.D., Pucciarelli, M.G., Godoy, M., Eisman, B., Casadesus, J. y 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.
- Ochman, H. y Groisman, E.A. (1996) Distribution of pathogenicity islands in *Salmonella* spp. *Infect Immun* **64**: 5410-5412.
- Ochman, H., Soncini, F.C., Solomon, F. y Groisman, E.A. (1996) Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 7800-7804.
- Ogura, T. y Hiraga, S. (1983) Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**: 4784-4788.
- Pandey, D.P. y Gerdes, K. (2005) Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res* **33**: 966-976.
- Pang, S., Octavia, S., Feng, L., Liu, B., Reeves, P.R., Lan, R. y Wang, L. (2013) Genomic diversity and adaptation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from analysis of six genomes of different phage types. *BMC Genomics* **14**: 718.
- Pasmans, F., Martel, A., Boyen, F., Vandekerchove, D., Wybo, I., Immerseel, F.V., Heyndrickx, M., Collard, J.M., Ducatelle, R. y Haesebrouck, F. (2005) Characterization of *Salmonella* isolates from captive lizards. *Vet Microbiol* **110**: 285-291.
- Patel, J.C. y Galán, J.E. (2006) Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. *J Cell Biol* **175**: 453-463.
- Patterson, S.K., Borewicz, K., Johnson, T., Xu, W. y Isaacson, R.E. (2012) Characterization and differential gene expression between two phenotypic phase variants in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PLoS One* **7**: e43592.
- Pecota, D.C. y Wood, T.K. (1996) Exclusion of T4 phage by the hok/sok killer locus from plasmid R1. *Journal of bacteriology* **178**: 2044-2050.

- Pedersen, K., Zaviyalov, A.V., Pavlov, M.Y., Elf, J., Gerdes, K. y Ehrenberg, M. (2003) The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. *Cell* **112**: 131-140.
- Pertschy, B., Schneider, C., Gnadig, M., Schafer, T., Tollervey, D. y Hurt, E. (2009) RNA helicase Prp43 and its co-factor Pfa1 promote 20 to 18 S rRNA processing catalyzed by the endonuclease Nob1. *J Biol Chem* **284**: 35079-35091.
- Pinel-Marie, M.L., Brielle, R. y Felden, B. (2014) Dual toxic-peptide-coding *Staphylococcus aureus* RNA under antisense regulation targets host cells and bacterial rivals unequally. *Cell Rep* **7**: 424-435.
- Powell, D.W., Mifflin, R.C., Valentich, J.D., Crowe, S.E., Saada, J.I. y West, A.B. (1999a) Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* **277**: C1-9.
- Powell, D.W., Mifflin, R.C., Valentich, J.D., Crowe, S.E., Saada, J.I. y West, A.B. (1999b) Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol* **277**: C183-201.
- Rajashekar, R., Liebl, D., Seitz, A. y Hensel, M. (2008) Dynamic remodeling of the endosomal system during formation of Salmonella-induced filaments by intracellular Salmonella enterica. *Traffic* **9**: 2100-2116.
- Ramage, H.R., Connolly, L.E. y Cox, J.S. (2009) Comprehensive functional analysis of Mycobacterium tuberculosis toxin-antitoxin systems: implications for pathogenesis, stress responses, and evolution. *PLoS Genet* **5**: e1000767.
- Rathman, M., Sjaastad, M.D. y Falkow, S. (1996) Acidification of phagosomes containing Salmonella typhimurium in murine macrophages. *Infect Immun* **64**: 2765-2773.
- Ren, D., Bedzyk, L.A., Thomas, S.M., Ye, R.W. y Wood, T.K. (2004) Gene expression in Escherichia coli biofilms. *Applied microbiology and biotechnology* **64**: 515-524.
- Ren, D., Kordis, A.A., Sonenshine, D.E. y Daines, D.A. (2014) The ToxAvapA toxin-antitoxin locus contributes to the survival of nontypeable Haemophilus influenzae during infection. *PLoS One* **9**: e91523.
- Ren, D., Walker, A.N. y Daines, D.A. (2012) Toxin-antitoxin loci vapBC-1 and vapXD contribute to survival and virulence in nontypeable Haemophilus influenzae. *BMC Microbiol* **12**: 263.
- Robson, J., McKenzie, J.L., Cursons, R., Cook, G.M. y Arcus, V.L. (2009) The vapBC operon from Mycobacterium smegmatis is an autoregulated toxin-antitoxin module that controls growth via inhibition of translation. *J Mol Biol* **390**: 353-367.
- Rodríguez, A., Pangloli, P., Richards, H.A., Mount, J.R. y Draughon, F.A. (2006) Prevalence of Salmonella in diverse environmental farm samples. *J Food Prot* **69**: 2576-2580.
- Rotger, R. y Casadesús, J. (1999) The virulence plasmids of Salmonella. *Int Microbiol* **2**: 177-184.
- Roth, J.R., Lawrence, J.G. y Bobik, T.A. (1996) Cobalamin (coenzyme B12): synthesis and biological significance. *Annu Rev Microbiol* **50**: 137-181.
- Rothenbacher, H. (1965) Mortality and morbidity in calves with salmonellosis. *J Am Vet Med Assoc* **147**: 1211-1214.
- Sala, A., Bordes P., y Genevaux, P. (2014) Multiple toxin-antitoxin systems in Mycobacterium tuberculosis. *Toxins (Basel)* **6**: 1002-1020.
- Salcedo, S.P. y Holden, D.W. (2003) SseG, a virulence protein that targets Salmonella to the Golgi network. *EMBO J* **22**: 5003-5014.
- Sambrook, J. y Pollack, R. (1974) Basic methodology for cell culture--cell transformation. *Methods Enzymol* **32**: 583-592.
- Sansonetti, P. (2002) Host-pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk. *Gut* **50 Suppl 3**: III2-8.
- Savageau, M.A. (1974) Genetic regulatory mechanisms and the ecological niche of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**: 2453-2455.
- Sberro, H., Leavitt, A., Kiro, R., Koh, E., Peleg, Y., Qimron, U. y Sorek, R. (2013) Discovery of functional toxin/antitoxin systems in bacteria by shotgun cloning. *Mol Cell* **50**: 136-148.

- Schaeffer, D., Tsanova, B., Barbas, A., Reis, F.P., Dastidar, E.G., Sanchez-Rotunno, M., Arraiano, C.M. y van Hoof, A. (2009) The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 56-62.
- Schmieger, H. (1972) Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities. *Mol Gen Genet* **119**: 75-88.
- Shao, Y., Harrison, E.M., Bi, D., Tai, C., He, X., Ou, H.Y., Rajakumar, K. y Deng, Z. (2011) TADB: a web-based resource for Type 2 toxin-antitoxin loci in bacteria and archaea. *Nucleic Acids Res* **39**: D606-611.
- Slattery, A., Victorsen, A.H., Brown, A., Hillman, K. y Phillips, G.J. (2013) Isolation of highly persistent mutants of *Salmonella enterica* serovar typhimurium reveals a new toxin-antitoxin module. *J Bacteriol* **195**: 647-657.
- Smith, H.W. (1965) Observations on the Flora of the Alimentary Tract of Animals and Factors Affecting Its Composition. *J Pathol Bacteriol* **89**: 95-122.
- Sojka, W.J., Wray, C., Shreeve, J. y Benson, A.J. (1977) Incidence of salmonella infection in animals in England and Wales 1968--1974. *J Hyg (Lond)* **78**: 43-56.
- Sorrell, J.M. y Caplan, A.I. (2009) Fibroblasts-a diverse population at the center of it all. *Int Rev Cell Mol Biol* **276**: 161-214.
- Spange, S., Wagner, T., Heinzl, T. y Kramer, O.H. (2009) Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol* **41**: 185-198.
- Starai, V.J. y Escalante-Semerena, J.C. (2004a) Acetyl-coenzyme A synthetase (AMP forming). *Cell Mol Life Sci* **61**: 2020-2030.
- Starai, V.J. y Escalante-Semerena, J.C. (2004b) Identification of the protein acetyltransferase (Pat) enzyme that acetylates acetyl-CoA synthetase in *Salmonella enterica*. *J Mol Biol* **340**: 1005-1012.
- Steeb, B., Claudi, B., Burton, N.A., Tienz, P., Schmidt, A., Farhan, H., Maze, A. y Bumann, D. (2013) Parallel exploitation of diverse host nutrients enhances *Salmonella* virulence. *PLoS Pathog* **9**: e1003301.
- Steele-Mortimer, O. (2008) The *Salmonella*-containing vacuole: moving with the times. *Curr Opin Microbiol* **11**: 38-45.
- Steele-Mortimer, O., Meresse, S., Gorvel, J.P., Toh, B.H. y Finlay, B.B. (1999) Biogenesis of *Salmonella* typhimurium-containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway. *Cell Microbiol* **1**: 33-49.
- Steif, A. y Meyer, I.M. (2012) The hok mRNA family. *RNA Biol* **9**: 1399-1404.
- Tan, Q., Awano, y Inouye, M. N. (2011) YeeV is an *Escherichia coli* toxin that inhibits cell division by targeting the cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB. *Mol Microbiol* **79**: 109-118.
- Thao, S., Chen, C.S., Zhu, H. y Escalante-Semerena, J.C. (2010) Nepsilon-lysine acetylation of a bacterial transcription factor inhibits its DNA-binding activity. *PLoS One* **5**: e15123.
- Thao, S. y Escalante-Semerena, J.C. (2011) Biochemical and thermodynamic analyses of *Salmonella enterica* Pat, a multidomain, multimeric N(epsilon)-lysine acetyltransferase involved in carbon and energy metabolism. *MBio* **2**.
- Thompson, L.J., Dunstan, S.J., Dolecek, C., Perkins, T., House, D., Dougan, G., Nguyen, T.H., Tran, T.P., Doan, C.D., Le, T.P., Nguyen, T.D., Tran, T.H., Farrar, J.J., Monack, D., Lynn, D.J., Popper, S.J. y 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**: 22433-22438.
- Tierrez, A. y García-del Portillo, F. (2005) New concepts in *Salmonella* virulence: the importance of reducing the intracellular growth rate in the host. *Cell Microbiol* **7**: 901-909.
- Tindall, B.J., Grimont, P.A., Garrity, G.M. y Euzéby, J.P. (2005) Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 521-524.
- Torreblanca, J., Marqués, S. y Casadesús, J. (1999) Synthesis of FinP RNA by plasmids F and pSLT is regulated by DNA adenine methylation. *Genetics* **152**: 31-45.

- Tsilibaris, V., Maenhaut-Michel, G., Mine, N. y Van Melderen, L. (2007) What is the benefit to *Escherichia coli* of having multiple toxin-antitoxin systems in its genome? *J Bacteriol* **189**: 6101-6108.
- Tsuchimoto, S. y Ohtsubo, E. (1989) Effect of the pem system on stable maintenance of plasmid R100 in various *Escherichia coli* hosts. *Mol Gen Genet* **215**: 463-468.
- Unsworth, K.E., Way, M., McNiven, M., Machesky, L. y Holden, D.W. (2004) Analysis of the mechanisms of Salmonella-induced actin assembly during invasion of host cells and intracellular replication. *Cell Microbiol* **6**: 1041-1055.
- Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S. y Bossi, L. (2001) Epitope tagging of chromosomal genes in Salmonella. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 15264-15269.
- van der Velden, A.W., Lindgren, S.W., Worley, M.J. y Heffron, F. (2000) Salmonella pathogenicity island 1-independent induction of apoptosis in infected macrophages by Salmonella enterica serotype typhimurium. *Infect Immun* **68**: 5702-5709.
- Van Melderen, L. y Saavedra De Bast, M. (2009) Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities? *PLoS Genet* **5**: e1000437.
- Vázquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Bäumlér, A.J., Falkow, S., Valdivia, R., Brown, W., Le, M., Berggren, R., Parks, W.T. y Fang, F.C. (1999) Extraintestinal dissemination of Salmonella by CD18-expressing phagocytes. *Nature* **401**: 804-808.
- Vázquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Mastroeni, P., Ischiropoulos, H. y Fang, F.C. (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**: 227-236.
- Vetting, M.W., LP, S.d.C., Yu, M., Hegde, S.S., Magnet, S., Roderick, S.L. y Blanchard, J.S. (2005) Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch Biochem Biophys* **433**: 212-226.
- Wagner, E.G. y Unoson, C. (2012) The toxin-antitoxin system *tisB-istR1*: Expression, regulation, and biological role in persister phenotypes. *RNA biology* **9**: 1513-1519.
- Wang, Q., Zhao, Y., McClelland, M. y Harshey, R.M. (2007) The RcsCDB signaling system and swarming motility in Salmonella enterica serovar typhimurium: dual regulation of flagellar and SPI-2 virulence genes. *J Bacteriol* **189**: 8447-8457.
- Wang, X., Kim, Y., Hong, S.H., Ma, Q., Brown, B.L., Pu, M., Tarone, A.M., Benedik, M.J., Peti, W., Page, R. y Wood, T.K. (2011) Antitoxin MqsA helps mediate the bacterial general stress response. *Nat Chem Biol* **7**: 359-366.
- Wang, X., Lord, D.M., Cheng, H.Y., Osbourne, D.O., Hong, S.H., Sánchez-Torres, V., Quiroga, C., Zheng, K., Herrmann, T., Peti, W., Benedik, M.J., Page, R. y Wood, T.K. (2012) A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. *Nature chemical biology* **8**: 855-861.
- Wang, X. y Wood, T.K. (2011) Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response. *Appl Environ Microbiol* **77**: 5577-5583.
- Wen, Y., Behiels, E. y Devreese, B. (2014) Toxin-Antitoxin systems: their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity. *Pathog Dis* **70**: 240-249.
- Winfield, M.D. y Groisman, E.A. (2003) Role of nonhost environments in the lifestyles of Salmonella and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 3687-3694.
- Winter, S.E., hiennimitr, P., TWinter, M.G., Butler, B.P., Huseby, D.L., Crawford, R.W., Russell, J.M., Bevins, C.L., Adams, L.G., Tsohis, R.M., Roth, J.R. y Bäumlér, A.J. (2010) Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for Salmonella. *Nature* **467**: 426-429.
- Winther, K.S. y Gerdes, K. (2009) Ectopic production of VapCs from Enterobacteria inhibits translation and trans-activates YoeB mRNA interferase. *Mol Microbiol* **72**: 918-930.
- Winther, K.S. y Gerdes, K. (2011) Enteric virulence associated protein VapC inhibits translation by cleavage of initiator tRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 7403-7407.

- Wray, C. y Sojka, W.J. (1978) Experimental *Salmonella typhimurium* infection in calves. *Res Vet Sci* **25**: 139-143.
- Yamaguchi, Y. y Inouye, M. (2011) Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin-antitoxin systems. *Nature reviews* **9**: 779-790.
- Yamaguchi, Y., Nariya, H., Park, J.H. y Inouye, M. (2012) Inhibition of specific gene expressions by protein-mediated mRNA interference. *Nat Commun* **3**: 607.
- Yamaguchi, Y., Tokunaga, N., Inouye, M. y Phadtare, S. (2014) Characterization of LdrA (long direct repeat A) protein of *Escherichia coli*. *J Mol. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 91-97.
- Yang, J., Chen, L., Sun, L., Yu, J. y Jin, Q. (2008) VFDB 2008 release: an enhanced web-based resource for comparative pathogenomics. *Nucleic Acids Res* **36**: D539-542.
- Yarmolinsky, M.B. (1995) Programmed cell death in bacterial populations. *Science* **267**: 836-837.
- Yoon, H., Ansong, C., Adkins, J.N. y Heffron, F. (2011) Discovery of *Salmonella* virulence factors translocated via outer membrane vesicles to murine macrophages. *Infect Immun* **79**: 2182-2192.
- Zarrineh, P., Sánchez-Rodríguez, A., Hosseinkhan, N., Narimani, Z., Marchal, K. y Masoudi-Nejad, A. (2014) Genome-scale co-expression network comparison across *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals significant conservation at the regulon level of local regulators despite their dissimilar lifestyles. *PLoS One* **9**: e102871.
- Zhang, Y. y Inouye, M. (2011) Rata (YfjG), an *Escherichia coli* toxin, inhibits 70S ribosome association to block translation initiation. *Mol Microbiol* **79**: 1418-1429.
- Zhang, Y., Zhang, J., Hara, H., Kato, I. y Inouye, M. (2005) Insights into the mRNA cleavage mechanism by MazF, an mRNA interferase. *J Biol Chem* **280**: 3143-3150.
- Zhao, C., B. Ge, De Villena, J., Sudler, R., Yeh, E., Zhao, S., White, D.G., Wagner, D. y Meng, J. (2001) Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, D.C., area. *Appl Environ Microbiol* **67**: 5431-5436.
- Zhao, E.Y., Bao, H.X., Tang, L., Zou, Q.H., Liu, W.Q., Zhu, D.L., Chin, J., Dong, Y.Y., Li, Y.G., Cao, F.L., Poppe, C., Sanderson, K.E., Johnston, R.N., Zhou, D., Liu, G.R. y Liu, S.L. (2013) Genomic comparison of *Salmonella typhimurium* DT104 with non-DT104 strains. *Mol Genet Genomics* **288**: 549-557.
- Zhu, L., Phadtare, S., Nariya, H., Ouyang, M., Husson, R.N. y Inouye, M. (2008) The mRNA interferases, MazF-mt3 and MazF-mt7 from *Mycobacterium tuberculosis* target unique pentad sequences in single-stranded RNA. *Mol Microbiol* **69**: 559-569.
- Zhu, L., Zhang, Y., Teh, J.S., Zhang, J., Connell, N., Rubin, H. y Inouye, M. (2006) Characterization of mRNA interferases from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **281**: 18638-18643.
- Zielenkiewicz, U. y Ceglowski, P. (2005) The toxin-antitoxin system of the streptococcal plasmid pSM19035. *Journal of bacteriology* **187**: 6094-6105.
- Zuckerkindl, E. y Pauling, L.B. (1962). "Molecular disease, evolution, and genic heterogeneity". En Kasha, M. y Pullman, B (editors). *Horizons in Biochemistry*. Academic Press, New York. pp.189-225.

ANEXOS

ANEXO I.

Listado de plásmidos recombinantes construidos durante esta Tesis Doctoral.

Nombre del plásmido	Gen clonado	Inductor	Finalidad
pAC-P _{lac} -HIS	-	IPTG	Plásmido usado para la clonación de toxinas marcadas con 6xHis
pFUS-P _{Ara} -HA	-	Arabinosa	Plásmido usado para la clonación de toxinas marcadas con HA
pCcdB	<i>ccdB</i>	Arabinosa	Análisis funcional de CcdB
pCcdBR99W	<i>ccdB</i> R99W	Arabinosa	Chequeo de aumento de toxicidad en CcdB
pAC-CcdA	<i>ccdA</i>	IPTG	Análisis funcional de CcdA
pAC-lbsA	<i>lbsA</i>	IPTG	Análisis funcional de lbsA
pAC-lbsB	<i>lbsB</i>	IPTG	Análisis funcional de lbsB
pAC-HIS-lbsB	6xHis- <i>lbsB</i>	IPTG	Detección de la expresión de lbsB
pHigB	<i>higB</i>	Arabinosa	Análisis funcional de HigB
pHA-HigB	HA- <i>higB</i>	Arabinosa	Detección de la expresión de HigB
pAC-HigA	<i>higA</i>	IPTG	Análisis funcional de HigA
pHok	<i>hok</i>	Arabinosa	Análisis funcional de Hok
pAC-LdrA	<i>ldrA</i>	IPTG	Análisis funcional de LdrA
pAC-LdrB	<i>ldrB</i>	IPTG	Análisis funcional de LdrB
pPhD	<i>phd</i>	Arabinosa	Análisis funcional de PhD
pAC-Doc	<i>doc</i>	IPTG	Análisis funcional de Doc
pPasT	<i>pasT</i>	Arabinosa	Análisis funcional de PasT
pPasT-Mut	<i>pasT</i> mutada en los 10 primeros aminoácidos	Arabinosa	Chequeo de aumento de toxicidad en PasT
pHA-PasT	HA- <i>pasT</i>	Arabinosa	Detección de la expresión de PasT

Nombre del plásmido	Gen clonado	Inductor	Finalidad
pAC-PasI	<i>pasI</i>	IPTG	Análisis funcional de PasI
pRelE	<i>relE</i>	Arabinosa	Análisis funcional de RelE
pAC-RelB	<i>relB</i>	IPTG	Análisis funcional de RelB
pRelE2	<i>relE2</i>	Arabinosa	Análisis funcional de RelE2
pAC-RelB2	<i>relB2</i>	IPTG	Análisis funcional de RelB2
pYafQ	<i>yafQ</i>	Arabinosa	Análisis funcional de YafQ
pAC-DinJ	<i>dinJ</i>	IPTG	Análisis funcional de DinJ
pAC-SymE	<i>symE</i>	IPTG	Análisis funcional de SymE
pAC-HIS-SymE	6xHis- <i>symE</i>	IPTG	Detección de la expresión de SymE
pA1	<i>a1</i>	Arabinosa	Análisis funcional de A1
pHA-A1	HA- <i>a1</i>	Arabinosa	Detección de la expresión de A1
pAC-T1	<i>T1</i>	IPTG	Análisis funcional de T1
pA2	<i>a2</i>	Arabinosa	Análisis funcional de A2
pAC-T2	<i>t2</i>	IPTG	Análisis funcional de T2
pParD	<i>parD</i>	Arabinosa	Análisis funcional de ParD
pAC-ParE	<i>parE</i>	IPTG	Análisis funcional de ParE
pT3	<i>t3</i>	Arabinosa	Análisis funcional de T3
pHA-T3	HA- <i>t3</i>	Arabinosa	Detección de la expresión de T3
pAC-A3	<i>a3</i>	IPTG	Análisis funcional de A3
pT4	<i>t4</i>	Arabinosa	Análisis funcional de T4
pAC-A4	<i>a4</i>	IPTG	Análisis funcional de A4
pRelB3	<i>relB3</i>	Arabinosa	Análisis funcional de RelB3
pHA-RelB3	HA- <i>relB3</i>	Arabinosa	Análisis funcional de RelB3
pAC-RelE3	<i>relE3</i>	IPTG	Análisis funcional de RelE3
pAC-RelE3.2	<i>relE3</i> con extensión N-terminal de 15 aminoácidos	IPTG	Chequeo de aumento de neutralización en RelB3
pSehA	<i>sehA</i>	Arabinosa	Análisis funcional de SehA

Nombre del plásmido	Gen clonado	Inductor	Finalidad
pAC-SehB	<i>sehB</i>	IPTG	Análisis funcional de SehB
pSehD	<i>sehD</i>	Arabinosa	Análisis funcional de SehD
pAC-SehC	<i>sehC</i>	IPTG	Análisis funcional de SehC
pA5	<i>a5</i>	Arabinosa	Análisis funcional de A5
pAC-T5	<i>t5</i>	IPTG	Análisis funcional de T5
pShpB	<i>shpB</i>	Arabinosa	Análisis funcional de ShpB
pAC-ShpA	<i>shpA</i>	IPTG	Análisis funcional de ShpA
pRelE4	<i>relE4</i>	Arabinosa	Análisis funcional de RelE4
pAC-RelB4	<i>relB4</i>	IPTG	Análisis funcional de RelB4
pTisB	<i>tisB</i>	Arabinosa	Análisis funcional de TisB
pVapC	<i>vapC</i>	Arabinosa	Análisis funcional de VapC
pAC-VapB	<i>vapB</i>	IPTG	Análisis funcional de VapB
pVapC2	<i>vapC2</i>	Arabinosa	Análisis funcional de VapC2
pAC-VapB2	<i>vapB2</i>	IPTG	Análisis funcional de VapB2

ANEXO II.

Oligonucleótidos usados en esta Tesis Doctoral.

Nombre	Secuencia (5' – 3')	Finalidad
HIS-PL5	GCA GGATCC GTAAGGGGAGGAAGACAATATGCATCATCAC CATCATCAC GACGTC AAG	Crear la secuencia espaciador con el epítipo 6xHis. Se marcan las dianas BamHI y Zral
HIS-PL3	CTT GACGTC GTGATGATGGTATGATGCATATTGTCTTCCTC CCTTTAC GGATCC TGC	Crear la secuencia espaciador con el epítipo 6xHis. Se marcan dianas BamHI y Zral
HA-PL5	AATTCGGTAAAGGGAGGAAGACAATATGTACCCATACGAT GTCCAGACTACGCTGAC	Crear la secuencia espaciador con el epítipo HA.
HA-PL3	GTCAGCGTAGTCTGGGACATCGTATGGGTACATATTGTCTT CCTCCCTTACCG	Crear la secuencia espaciador con el epítipo HA.
T1-zra	GCC GACGTC ATGAAAAGATTACGCAGTAAAATG	Clonación de la toxina <i>t1</i> . Se marca la diana Zral
T1-spe	GCC ACTAGT TTAGTCCGCCTCATTGATACCTAAACG	Clonación de la toxina <i>t1</i> . Se marca la diana SpeI
A1-zra	GCC GACGTC ATGTTCAAGGAACGGATGACGCCAGAAG	Clonación de la antitoxina <i>a1</i> . Se marca la diana Zral
A1-spe	GCC ACTAGT TTATTTGCTATCGGTATCCCTAAGCGTTG	Clonación de la antitoxina <i>a1</i> . Se marca la diana SpeI
T2-zra	GCC GACGTC ATGATGTTTACAGACTGGCATGAG	Clonación de la toxina <i>t2</i> . Se marca la diana Zral
T2-spe	GCG ACTAGT GTCATAACCTACCAGATGCAGATAAAG	Clonación de la toxina <i>t2</i> . Se marca la diana SpeI
A2-zra	GCC GACGTC ATGAAAACCATGCCTCAGATAGC	Clonación de la antitoxina <i>a2</i> . Se marca la diana Zral
A2-spe	GCG ACTAGT CCAGTCTGTAACATCATTCTTC	Clonación de la antitoxina <i>a2</i> . Se marca la diana SpeI
ParE-zra	GCC GACGTC ATGGTAAAATTAACGCCAAAG	Clonación de la toxina <i>parE</i> . Se marca la diana Zral
ParE-spe	GCC ACTAGT CTATAACCAATTTACATGCTTAC	Clonación de la toxina <i>parE</i> . Se marca la diana SpeI
ParD-zra	GCC GACGTC ATGACCGTTGATCTTGCGATGAA	Clonación de la antitoxina <i>parD</i> . Se marca la diana Zral
ParD-spe	GCC ACTAGT TCACTGGCCTTTGGCGTTAATTTTACC	Clonación de la antitoxina <i>parD</i> . Se marca la diana SpeI

Nombre	Secuencia (5' – 3')	Finalidad
T3-zra	GCC GACGTC ATGAGCGATAAATTTGGCGAAGG	Clonación de la toxina <i>t3</i> . Se marca la diana ZraI
T3-spe	GCC ACTAGT TTACTCAGTTTCGCGAGCTTCGCTTATC	Clonación de la toxina <i>t3</i> . Se marca la diana SpeI
A3-zra	GCC GACGTC GTGAAGAACTTACCGATAAACAAAAGTC	Clonación de la antitoxina <i>a3</i> . Se marca la diana ZraI
A3-spe	GCC ACTAGT ATTTATCGCTCATAGTGCCTCCGAAG	Clonación de la antitoxina <i>a3</i> . Se marca la diana SpeI
T4-zra	GG GACGTC GTGGGACGTGTAACAGCACCAGAACCTTTG	Clonación de la toxina <i>t4</i> . Se marca la diana ZraI
T4-spe	GG ACTAGT CTATTGAGGGAGCCTAAGGAACAATGTTC	Clonación de la toxina <i>t4</i> . Se marca la diana SpeI
A4-zra	GGC GACGTC ATGCTATACAAGGGGTGTCTCATGAAATC	Clonación de la antitoxina <i>a4</i> . Se marca la diana ZraI
A4-spe	GGC ACTAGT TTACACGTCCCACTGAGGTTTC	Clonación de la antitoxina <i>a4</i> . Se marca la diana SpeI
RelE3-zra	GGC GACGTC ATGCGAACCTTCAAACCCAGGTG	Clonación de la toxina <i>relE3</i> . Se marca la diana ZraI
RelE3.2-zra	GCG GACGTC GTGTATCACCTGGTGCTATAC	Clonación de la toxina <i>relE3</i> con el dominio N-terminal extendido. Se marca la diana ZraI
RelE3-spe	GGC ACTAGT TAGTTTTTGCTGACATGGCGCACCTCTAC	Clonación de la toxina <i>relE3</i> . Se marca la diana SpeI
RelB3-zra	GGC GACGTC ATGTCAGCAAAAATAAATTC	Clonación de la antitoxina <i>relB3</i> . Se marca la diana ZraI
RelB3-spe	GCC ACTAGT CATACCAGCACCTTTAGC	Clonación de la antitoxina <i>relB3</i> . Se marca la diana SpeI
SehA-zra	GCT GACGTC GTGCATGTTATCAGCCGAAAACC	Clonación de la toxina <i>sehA</i> . Se marca la diana ZraI
SehA -spe	GCC ACTAGT TCATTCTTTATTACCCGATAGTATGC	Clonación de la toxina <i>sehA</i> . Se marca la diana SpeI
SehB -zra	GGC GACGTC ATGGATGCAACCAGCGCAAAAAGATCGTTG	Clonación de la antitoxina <i>sehB</i> . Se marca la diana ZraI
SehB -spe	GGC ACTAGT CTACTCGATGAAGGCATCTGCTGGTAGTTTG	Clonación de la antitoxina <i>sehB</i> . Se marca la diana SpeI
SehD -zra	GCC GACGTC ATGCAATTTATAGAAACGGAAC	Clonación de la toxina <i>sehD</i> . Se marca la diana ZraI
SehD-spe	GCC ACTAGT CTACCACCTCTCATTACAGCATAC	Clonación de la toxina <i>sehD</i> . Se marca la diana SpeI

Nombre	Secuencia (5' – 3')	Finalidad
SehC -zra	GCC GACGTC ATGGATAAAGTGTATTGAGCGATTAAC	Clonación de la antitoxina <i>sehC</i> . Se marca la diana ZraI
SehC-spe	GCC ACTAGT TCATAACGCAATGCTTGATAACGTTTC	Clonación de la antitoxina <i>sehC</i> . Se marca la diana SpeI
T5-zra	GCC GACGTC ATGATCTCCACCCCTGAG	Clonación de la toxina <i>t5</i> . Se marca la diana ZraI
T5-spe	GCC ACTAGT GATGCGTTCTGGAGTTTAAC	Clonación de la toxina <i>t5</i> . Se marca la diana SpeI
A5-zra	GCC GACGTC ATGCCAGCCGCAACAGTATG	Clonación de la antitoxina <i>a5</i> . Se marca la diana ZraI
A5-spe	GCC ACTAGT CTCAGGGGTGGAGATCATTTTCC	Clonación de la antitoxina <i>a5</i> . Se marca la diana SpeI
ShpA-zra	GCC GACGTC ATGCCGATGGAGTTTGAATGGGATGC	Clonación de la toxina <i>shpA</i> . Se marca la diana ZraI
ShpA-spe	GCC ACTAGT TTAACCATGCTCATAACGATTCTCTC	Clonación de la toxina <i>shpA</i> . Se marca la diana SpeI
ShpB-zra	GCC GACGTC ATGAGCATGGTTAAACATAAAC	Clonación de la antitoxina <i>shpB</i> . Se marca la diana ZraI
ShpB-spe	GCC ACTAGT CGGGCTATTTCTATTTTGCTC	Clonación <i>shpB</i> antitoxina. Se marca la diana SpeI
RelE4-zra	GCC GACGTC ATGATGGAGATATTCTGGACCATG	Clonación de la toxina <i>relE4</i> . Se marca la diana ZraI
RelE4-spe	GCC ACTAGT CTATGGCCACTTCTGTGAGTATG	Clonación de la toxina <i>relE4</i> . Se marca la diana SpeI
RelB4-spe	GCC ACTAGT ATGGCACAGGTTAATATGAGTTAAG	Clonación de la antitoxina <i>relB4</i> . Se marca la diana SpeI
RelB4-spe2	GCC ACTAGT TCATTTACGGCAACCTTCC	Clonación de la antitoxina <i>relB4</i> . Se marca la diana SpeI
CcdB-zra	GCC GACGTC ATGCAGTTAAGGTTTACAC	Clonación de la toxina <i>ccdB</i> . Se marca la diana ZraI
CcdB-spe	GCC ACTAGT TCAGATCCCCCGAACATC	Clonación de la toxina <i>ccdB</i> . Se marca la diana SpeI
CcdB-mut-5	CCATTAACCTGATGTTCTGGGGGATCTGAACTAG	Introducción de la mutación R99W en <i>ccdB</i> . Se marca el cambio de nucleótido.
CcdB-mut-3	CTAGTTCAGATCCCCAAGAACATCAGGTTAATGG	Introducción de la mutación R99W en <i>ccdB</i> . Se marca el cambio de nucleótido.
CcdA-zra	GCC GACGTC ATGAAGCAGCGAATTACAGTGACAG	Clonación de la antitoxina <i>ccdA</i> . Se marca la diana ZraI
CcdA-spe	GCC ACTAGT TCACCAGTTCTGTTGTCGTCAGCAAAC	Clonación de la antitoxina <i>ccdA</i> .

Nombre	Secuencia (5' – 3')	Finalidad
DinJ-zra	GCC GACGTC ATGGCTGCAAATGCGCTTG	Clonación de la antitoxina <i>dinJ</i> . Se marca la diana ZraI
DinJ-spe	GCC ACTAGT TCAGATCCCTAACTGGTCAAACAAATC	Clonación de la antitoxina <i>dinJ</i> . Se marca la diana SpeI
YafQ-zra	GCC GACGTC ATGGGGCAAAGGAAATTGAATATTC	Clonación de la toxina <i>yafQ</i> . Se marca la diana ZraI
YafQ-spe	GCC ACTAGT TTAAAATAAATCGGCATGCGTTCCTGTTGTTTC	Clonación de la toxina <i>yafQ</i> . Se marca la diana SpeI
lbsA-zra	GCC GACGTC ATGATGCACCAGGTCATCATAC	Clonación de la toxina <i>lbsA</i> . Se marca la diana ZraI
lbsA-spe	GCC ACTAGT CCTCTGATTGTCTGTTAGTAAG	Clonación de la toxina <i>lbsA</i> . Se marca la diana SpeI
lbsB-zra	GCC GACGTC ATGTGGCTTAACGTCAGGAGTGAGGGTAAG	Clonación de la <i>lbsB</i> toxina. Se marca la diana ZraI
lbsB-spe	GCC ACTAGT TGATTAGCCTACCAGCTTACTAAGACAC	Clonación toxina <i>lbsB</i> . Se marca la diana SpeI
HigB-zra	GCG GACGTC GTGGGATCTTCTCTGGAGGATC	Clonación de la toxina <i>higB</i> . Se marca la diana ZraI
HigB-spe	GCC ACTAGT TCACAAGCTGTTTCTCCGTTGTTGC	Clonación de la toxina <i>higB</i> . Se marca la diana SpeI
HigA-zra	GCG GACGTC GTGATTGCCAAAAGTATAG	Clonación de la antitoxina <i>higA</i> . Se marca la diana ZraI
HigA-spe	GCC ACTAGT TTACGGCCCTACCATTACC	Clonación de la antitoxina <i>higA</i> . Se marca la diana SpeI
Hok-zra	GCC GACGTC ATGCCACAGCGAACGTTTTTAATG	Clonación de la toxina <i>hok</i> . Se marca la diana ZraI
Hok-spe	GCC ACTAGT TTAACGTTAACTTCGTAGGCTAAC	Clonación de la toxina <i>hok</i> . Se marca la diana SpeI
Doc-zra	GCC GACGTC ATGACCCTACAACCTATCTCAG	Clonación de la toxina <i>doc</i> . Se marca la diana ZraI
Doc-spe	GTA ACTAGT CCGGGATTAACGTCTCAGG	Clonación de la toxina <i>doc</i> . Se marca la diana SpeI
Phd-zra	GGCC GACGTC ATGTTTATGCGTACGGTAACTATAGCG	Clonación de la antitoxina <i>phd</i> . Se marca la diana ZraI
Phd-spe	GGT ACTAGT GGTCATTTATCCGCCAGCTCCCTGAG	Clonación de la antitoxina <i>phd</i> . Se marca la diana SpeI
LdrA-zra	GCC GACGTC ATGACGCTTACGCAGTTGGGCGTGGTCTTCTG	Clonación de la toxina <i>ldrA</i> . Se marca la diana ZraI

Nombre	Secuencia (5' – 3')	Finalidad
LdrA-spe	GCC ACTAGT TACTTCCTGTCACGTAGCCAGTTGACGATC	Clonación de la toxina <i>ldrA</i> . Se marca la diana SpeI
LdrB-zra	GCC GACGTC ATGACGCTCACAGAGTTGAGCATTACTATC	Clonación de la toxina <i>ldrB</i> . Se marca la diana ZraI
LdrB-spe	GCC ACTAGT CGCCCACTTCACATTACTCCG	Clonación de la toxina <i>ldrB</i> . Se marca la diana SpeI
PasT-zra	GCG GACGTC GTGGTATTATTACACGATTTATGTTG	Clonación de la toxina <i>pasT</i> . Se marca la diana ZraI
PasT-spe	GCC ACTAGT TTATCCGGCACGGTAAACCTCTTTG	Clonación de la toxina <i>pasT</i> . Se marca la diana SpeI
PasT-mut-zra	GACGTC ATGATATTATTGTAGGATTTCTGTTGATGGGAATT GCTATGC	Introducción de la mutación N-terminal en <i>pasT</i> .
PasI-zra	GCG GACGTC GTGCCGATAAACTTGTTGGTTG	Clonación de la antitoxina <i>pasI</i> . Se marca la diana ZraI
PasI-spe	GCG ACTAGT AAAAGAGGCTAATTATCTACCAG	Clonación de la toxina <i>pasI</i> . Se marca la diana SpeI
RelE-zra	GCC GACGTC ATGACTTATAAGCTGGCATTTAACG	Clonación de la toxina <i>relE</i> . Se marca la diana ZraI
RelE-spe	GCC ACTAGT TTAGCTTCTGTGCTGTGCATTTTG	Clonación de la toxina <i>relE</i> . Se marca la diana SpeI
RelB-zra	GCC GACGTC ATGGCATTTCAAATTTAAGACTAC	Clonación de la antitoxina <i>relB</i> . Se marca la diana ZraI
RelB-spe	GCC ACTAGT TTATAAGTCATCAATGTTGACCTCAATG	Clonación de la antitoxina <i>relB</i> . Se marca la diana SpeI
RelE2-zra	GCC GACGTC ATGACTTATGAACTGGAATTCG	Clonación de la toxina <i>relE2</i> . Se marca la diana ZraI
RelE2-spe	GCC ACTAGT ATCGCTAAAGCCGTTTGTTG	Clonación de la toxina <i>relE2</i> . Se marca la diana SpeI
RelB2-zra	GCC GACGTC ATGGCCAGCTGAACGTCCGTCTGGATGACAA ACTC	Clonación de la antitoxina <i>relB2</i> . Se marca la diana ZraI
RelB2-spe	GCC ACTAGT TCATAAGTCATCCAGACTAACCTTGATTC	Clonación de la antitoxina <i>relB2</i> . Se marca la diana SpeI
SymE-zra	GCC GACGTC ATGACTACCGTCCATTCTATTG	Clonación de la toxina <i>symE</i> . Se marca la diana ZraI
SymE-spe	GCC ACTAGT ATTTTATGCGTTTACTTAGAACCTG	Clonación de la toxina <i>symE</i> . Se marca la diana SpeI
TisB-zra	GCC GACGTC ATGAGCGTAGTGGATATCACCATTG	Clonación de la toxina <i>tisB</i> . Se marca la diana ZraI

Nombre	Secuencia (5' – 3')	Finalidad
TisB-spe	GCG ACTAGT GGCTTGAATCTGAATTACTTAAGG	Clonación de la toxina <i>tisB</i> . Se marca la diana SpeI
VapC-zra	GCC GACGTC ATGCTGAAATTCATGCTTGATAC	Clonación de la toxina <i>vapC</i> . Se marca la diana ZraI
VapC-spe	GCC ACTAGT TTAGCACCAGTCTTCGATTCCGGATACC	Clonación de la toxina <i>vapC</i> . Se marca la diana SpeI
VapB-zra	GCC GACGTC ATGTATTCAGAAATGCCGGAGTCGGAC	Clonación de la antitoxina <i>vapB</i> . Se marca la diana ZraI
VapB-spe	GCC ACTAGT TCAAAATCCTTCCGTTCTGTAAGT	Clonación de la antitoxina <i>vapB</i> . Se marca la diana SpeI
VapC2-zra	GCC GACGTC ATGCTGAAGTTTATGCTGGATACTAAC	Clonación de la toxina <i>vapC2</i> . Se marca la diana ZraI
VapC2-spe	GCC ACTAGT TCAGCTCCAGTCTCAGTTCTCAG	Clonación de la toxina <i>vapC2</i> . Se marca la diana SpeI
VapB2-zra	GCC GACGTC ATGATGGAAACCAGCGTATTTCTC	Clonación de la antitoxina <i>vapB2</i> . Se marca la diana ZraI
VapB2-spe	GCC ACTAGT TCAGAATGATTCCTCCGTTCTCTG	Clonación de la antitoxina <i>vapB2</i> . Se marca la diana SpeI
Fw-del-Phd-Doc	GCGAACGAAGCGGTGCGCAGCGCCTATCTGGGCGGTTAGA CTGTGCCAGGTCTCTACGCCGGACGCATCGTG	Amplificación del módulo <i>Km-parE</i> a partir de pKD267 para deleccionar <i>phd-doc</i> .
Rv-del-Phd-Doc	CGGCGCACATGCCGTAACCCAACCAGGCGGAGCGTCGCGG GGATTAACGTCAGTATCAGTGATAAGCTGTC	Amplificación del módulo <i>Km-parE</i> a partir de pKD267 para deleccionar <i>phd-doc</i> .
Fw-del-TA2	GCTGGACTATATCAGCCTCATATGTACGCCTTCAAAGCGT ACAGATATGTCTCTACGCCGGACGCATCGTG	Amplificación del módulo <i>Km-parE</i> a partir de pKD267 para deleccionar <i>ta2</i> .
Rv-del-TA2	CCTGTATCCTTATCGTTGGCCGATTCTGAATTATCAACAAA GCCTCATGTTGACTGATCAGTGATAAGCTGTC	Amplificación del módulo <i>Km-parE</i> a partir de pKD267 para deleccionar <i>ta2</i> .
Fw-del-ParDE	GGCTCAGAATACGTATCACGATAACTCCGTAAGTATTGT ATAAAATAGTCTCTACGCCGGACGCATCGTG	Amplificación del módulo <i>Km-parE</i> a partir de pKD267 para deleccionar <i>parDE</i> .
Rv-del-ParDE	CCGGTGTACTCTTATGTAAGATTTATACTTACAGTGGAGGCT GTTATGGCCACTGATCAGTGATAAGCTGTC	Amplificación del módulo <i>Km-parE</i> a partir de pKD267 para deleccionar <i>parDE</i> .
Fw-del-TA4	GACATTCTATCAAATTATCGCTTATAGCGATTTGAACATAAC AGTCTTTGTCTCTACGCCGGACGCATCGTG	Amplificación del módulo <i>Km-parE</i> a partir de pKD267 para deleccionar <i>ta4</i> .
Rv-del-TA4	CCGCTTCTGGCACAAGCGAACATCAGTATTCAAAAATGA AAAACGACGAACTGATCAGTGATAAGCTGTC	Amplificación del módulo <i>Km-parE</i> a partir de pKD267 para deleccionar <i>ta4</i> .
TA4-5.1	CAGTAAAGGCGCTGTATCGTACAAAAAG	Amplificación de la región homóloga aguas arriba a <i>ta4</i>
TA4-3.1	GCCCTCGAGCAAAGACTGTTATGTTCAAATCG	Amplificación de la región homóloga anterior a <i>ta4</i>
TA4-5.2	GCCCTCGAGTCGTCGTTTTTCATTTTTGAATACTG	Amplificación de la región homóloga

Nombre	Secuencia (5' – 3')	Finalidad
TA4-3.2	GCGAGGAACGGACGCCCTATTTAC	posterior a <i>ta4</i> Amplificación de la región homóloga posterior a <i>ta4</i>
Fw-del- TA5	GACATCTGCGTTACGCGTGTGTATGCTTAATATCCACAGAA GTACAAGAGTCTCTACGCCGGACGCATCGTG	Amplificación del módulo <i>Km-parE</i> a partir de pKD267 para delecionar <i>ta5</i> .
Rv-del- TA5	TTAAACTCTCCACCAATCCCCAACGTCCACATCAACAT CATCGGATCACTGATCAGTGATAAGCTGTC	Amplificación del módulo <i>Km-parE</i> a partir de pKD267 para delecionar <i>ta5</i> .
Fw-del- RelBE	GAGCCTGTTTGTGATCGTTTACGGAAAGAGAGCATT TCTGAGTGATCTCTACGCCGGACGCATCGTG	Amplificación del módulo <i>Km-parE</i> a partir de pKD267 para delecionar <i>relBE</i> .
Rv-del- RelBE	CCGTTTTCAGTGATCATAAGTTAGTTCTGGACATCTGAAA TTAGCCTTGACTGATCAGTGATAAGCTGTC	Amplificación del módulo <i>Km-parE</i> a partir de pKD267 para delecionar <i>relBE</i> .
Fw-del- VapBC2	TAACGGCGGCACCTCCCGCCGACCGGACCTGCGCAATACT CATCATAAATCTCTACGCCGGACGCATCGTG	Amplificación del módulo <i>Km-parE</i> a partir de pKD267 para delecionar <i>vapBC2</i> .
Rv-del- VapBC2	CTGATACGCCATCAGAAATCATCTCCCGGCTCCGGTTCATC CTTCCGTAAGTATCAGTGATAAGCTGTC	Amplificación del módulo <i>Km-parE</i> a partir de pKD267 para delecionar <i>vapBC2</i> .
VapBC2- 5.1	CCGTTTGGCCACCTTATCGCTGCTC	Amplificación de la región homóloga anterior a <i>vapBC2</i>
VapBC2- 3.1	GGAGATGATTCTGATGGCGGTATCAGTTTATGATGAGTAT TGCGCAGGTCCGGTC	Amplificación de la región homóloga anterior a <i>vapBC2</i>
VapBC2- 5.2	GGACCTGGCAATACTCATCATAAATGATACCGCCATCAG AAATCATCTC	Amplificación de la región homóloga posterior a <i>vapBC2</i>
VapBC2- 3.2	GCTGGCCCTGAAATACCAGGAAC	Amplificación de la región homóloga posterior a <i>vapBC2</i>
Fw-del- TisB	CGGGATTGATGATCACGCATTTACAATGCCGAAAACAAA AAACCTCGCTCTCTACGCCGGACGCATCGTG	Amplificación del módulo <i>Km-parE</i> a partir de pKD267 para delecionar <i>tisB-istR</i> .
Rv-del- TisB	CCCTTCGGTGCGGCTTGAATCTGAATTACTTAAGGTATTTCA GAACAGCAACTGATCAGTGATAAGCTGTC	Amplificación del módulo <i>Km-parE</i> a partir de pKD267 para delecionar <i>tisB-istR</i> .
Fw-del- LdrA	ACGCGTACTTCTGTACGTCAGTAGCCAGTTGACGATCACACTG GCGATAATTCTCTACGCCGGACGCATCGTG	Amplificación del módulo <i>Km-parE</i> a partir de pKD267 para delecionar <i>ldrA-rdIA</i> .
Rv-del- LdrA	CAGCAAGCCGGGTTTACCCGGTGAGGCGCAATGTTGCGGG GGTTTGATCCACTGATCAGTGATAAGCTGTC	Amplificación del módulo <i>Km-parE</i> a partir de pKD267 para delecionar <i>ldrA-rdIA</i> .
LdrA-5.1	CCGGCGTAAGGTGATGGTAG	Amplificación de la región homóloga anterior a <i>ldrA-rdIA</i>
LdrA-3.1	AATGTTGCGGGGTTTATGATCCATTATCGCCAGTGTGATCGT CAACT	Amplificación de la región homóloga anterior a <i>ldrA-rdIA</i>
LdrA-5.2	AGTTGACGATCACACTGGCGATAATGGATCAAACCCCGCA ACATT	Amplificación de la región homóloga posterior a <i>ldrA-rdIA</i>
LdrA-3.2	CCAGGCTATAGTCCTTGATACC	Amplificación de la región homóloga posterior a <i>ldrA-rdIA</i>

Nombre	Secuencia (5' – 3')	Finalidad
Fw-del-Hok	TAATGCCTAGACAACATTATAGTAGCCCGATAACCGCCGTA AGGCAATGTCTCTACGCCGGACGCATCGTG	Amplificación del módulo <i>Km-parE</i> a partir de pKD267 para deleccionar <i>hok-sok</i> .
Rv-del-Hok	AAACAATACCGGATACGCTTCATTGAAGAAGAAAGGGCGC AATGAGGTCAACTGATCAGTGATAAGCTGTC	Amplificación del módulo <i>Km-parE</i> a partir de pKD267 para deleccionar <i>hok-sok</i> .
Hok-5.1	GCTTATGTTGGCGGCGTTGTTAC	Amplificación de la región homóloga anterior a <i>hok-sok</i>
Hok-3.1	GAAGAAAGGGCGCAATGAGGTCACATTGCCTTACGGCGGT TATCG	Amplificación de la región homóloga anterior a <i>hok-sok</i>
Hok-5.2	CGATAACCGCCGTAAGGCAATGTGACCTCATTGCGCCCTTT CTTC	Amplificación de la región homóloga posterior a <i>hok-sok</i>
Hok-3.2	GCTGACATGCCGAGTATACAC	Amplificación de la región homóloga posterior a <i>hok-sok</i>
Fw-tag-VapC2	ACACCCGGGAGTTTGAACGTGTGGGTGGACTGAGAAGTGA GGACTGGAGCGACTACAAAGACCATGACGGTG	Amplification <i>km-3xFLAG</i> cassette from pSUB11 to tag VapC2.
Rv-tag-VapC2	CGGAAAGGATGAACCGGAGCCGGGAGATGATTCTGATGG CGGTATCAGCATATGAATATCCTCCTTAGTTCC	Amplification <i>km-3xFLAG</i> cassette from pSUB11 to tag VapC2.
Fw-tag-T2	GTTGCTGTCGTTTAAAACGCTTTATGCTGCTTTATCTGCATCT GGTAGGTTAGACTACAAAGACCATGACGGTG	Amplification <i>km-3xFLAG</i> cassette from pSUB11 to tag T2.
Rv-tag-T2	GTATCCTTATCGTTGGCCGATTCTGAATTATCAACAAAGCC TCATGTTGTCACATATGAATATCCTCCTTAGTTCC	Amplification <i>km-3xFLAG</i> cassette from pSUB11 to tag T2.
Fw-tag-T4	TCAAATCATCACAACACTCAGCAGCGAACATTGTCCTTAGGC TCCCTCAAGACTACAAAGACCATGACGGTG	Amplification <i>km-3xFLAG</i> cassette from pSUB11 to tag T4.
Rv-tag-T4	TTCTATCAAATTATCGCTTATAGCGATTTGAACATAACAGTC TTTGCATTCTACATATGAATATCCTCCTTAGTTCC	Amplification <i>km-3xFLAG</i> cassette from pSUB11 to tag T4.
Fw-tag-T5	GGATCCGATGATGTTGATGGTGACGTTGGGGGATTGGTG GAGAGTGTGACTACAAAGACCATGACGGTG	Amplification <i>km-3xFLAG</i> cassette from pSUB11 to tag T5.
Rv-tag-T5	CACAGCGAATCCGGCCATCAGAAGCTAAGGGATGCGTTCT GGAGTTTACATATGAATATCCTCCTTAGTTCC	Amplification <i>km-3xFLAG</i> cassette from pSUB11 to tag T5.
pFUS-sec	CTGTATCAGGCTGAAAATCTTCTCTC	Secuenciación de las toxinas/antitoxinas clonadas
pAC-sec	CATAATGGGGAAGGCCATCCAG	Secuenciación de las toxinas/antitoxinas clonadas
hok Fw	GTCTGGATGGTGAGGGATTTCG	RT-qPCR
hok Rv	CAAGCACTGTGTTCCCTGC	RT-qPCR
ibsA Fw	GCACCAGGTCATCATAC	RT-qPCR
ibsA Rv	GCTGCGAAACTTATC	RT-qPCR
ldrA Fw	GGCGTGGTCTTCTGGCACG	RT-qPCR

ANEXOS

Nombre	Secuencia (5' – 3')	Finalidad
ldrA Rv	TTACTTCCTGTCACGTAGCC	RT-qPCR
ldrB Fw	TTGAGCATTACTATCTGGCAGAT	RT-qPCR
ldrB Rv	AAAAACAGACCTGTCGCAATCC	RT-qPCR
tisB Fw	GCGTAGTGGATATCACCATT	RT-qPCR
tisB Rv	TTAAGGTATTCAGAACAGC	RT-qPCR

ANEXO III.

Secuencias de aminoácidos de las proteínas usadas en la identificación proteómica de toxinas y antitoxinas.

>A1

MFKERMTPEELANLTGYSRQTINKWVRKEGWATSPKPGVQGGKARLVHVNEQVREYIRSAERSVDHHDADTFTP
ASNASLEALLMTLAKEMTSSEKQFTSLLVREGITGLLQRLGIRDSK

>A2

MKTMPQIAIESNERLSLRVSTDAKKLIVRAAAIQQTNLDFVVSNILPVAQKIVDAAERVYLTERTDKMIMEILDNP
PAPNEKLLAAAFALPDMKK

>A3

VKKLTDKQKSRFWEQRRNVNFQSSRRLEGIEIPLVTLTADALVRLDELRRHYER

>A4

MLYKGCLMKSDVQLNLRAKESQRALIDAAAEILHKSRTDFILETACQAAEKVILDRRVFNFNDEQYEEFINLLDAPV
ADDPVIEKLLARKPQWDV

>A5

MPAANSAMMKRETLNLRKPAERDLIDRAAKARGKNRTDFVLEAARAAAEEALIEQRIIMADPEAYQEFLVRLDQ
TPSPNAALRKTMTQTPAPWEQEK

>CcdA

MKQRITVTVDSQYLLKAYDVNISGLVSTTMQNEARRLRAERWQEENREGMAEVASFIEANGSFADDNRNW

>DinJ

MAANALVRARIDETLKDQAADVLAEMGLTISDLIRITLTKVAREKALPFDLRIPNELTSRTIENSEAGVDIHKAKDAD
DLFDQLGI

>HigA

VIAKTSDIRHVTPSGGNVFADLGFHKQDAEKFYADSLNEIENTLAIKQQLMEEITLWITQNMKQAEVATVLHIS
RPRVSDVVNKKCSKFTIDALVNMLSIRIGKPVVVMVGP

>ParD

MTVDLGDELREFIESLIESGDYRTQSEVIRESLRLLREKQAESRLQALRELLAEGLNSEGPQAWEKDAFLRKVKGTGM
IKPDENGKINAKGQ

>Pasi

VPDKLVVEVAYALPEKQYLQRVTLEEGATVEEAIASGLLELRTDIDLAKNKVGIYSRPVKLTDTVQDGRVEIYRPL
IADPKALRRQRAEKSAGR

>Phd

MFMRTVNYSEARQNLAEVLESAVTGGPVTTITRRGHKSAVIISAEEFERYQTARMDDEFAAIMAVHGNELRELADK

>RelB

MAFQILTTTAASITELKRDPMGTFNAGDGAPVAILNRNEPAFYCVPPALYAHLMIDILEDEELGRIIDERANERVIEV
NIDDL

>RelB2

MATLNVRLDDKLNKNEAYAVLEKLNITPTEAVRLLFQYVAETGRMPVKTVTLSDSEDALIQTVRERLSSPQKGIKVS
DDL

>RelB3

MSAKTKFKSPAPEPIHSAASGLFSVDAIPQETMRSFDTACLSSIKDLQPLEIKALREKLNVSQPVFARYLNTSVSTVQ
KWESGAKRPSGMSLKLLNVVQKHGLKVLV

>RelB4

MAQVNMSLRIDAELKDAFMAAAASMDRNGSQLIRDFMRQTVERQHNTWFRDQVAAGRQQLHGDVLP
MVESSAAAWRDEMSRKVAGK

>SehB

MDATSAKKIVDTFSDAVKTVPLMGEDRNDNEYRRALALVEFLVDHDDLENPLFELLCARISEYEKHAPEFKALNQ
LEKTPPGVSVLRTLMDQYGLKAADLANELGSKSNVSNILNGRRALTVNHKALTQRFKLPADAFIE

>SehC

MQFIETELFTEDVKLLDDDEYHKLQVFMAQHPDCGDVIQETGGLRKMWRWGARGKGRSGVRIIFHRSQRYEI
RLLLIYQKGIKDDLTPQEKAVLRMLNERW

>ShpB

MSMVKHKRGNASALSAQHEAELKALAKKSDDEIDYSDIPASEDGQWSEAVRGKFFRPLKTQASVRIDADVMEW
LKRPGKGYQTRLNAILREAMLREQNKK

>VapB

MYSEMPESDKDALRSARHVTGLFFPVYLFDIYIASTHNGYTRCISRKEAVMHTTLFFSNRTQAVRLPKSISFPEDVK
HVEIIAVGRSRIITPVGESWDSWFDGEGASTDFMSTREQPAVQEREGF

>VapB2

MMETSVFLSNRSQAVRLPKAVALPENVKRVEVIAVGRTRIITPAGESWDEWFDGNNVSADFMDNREQPSVQER
ESF

>CcdB

MQFKVYTCKRESRYRLFVDVQSDIIDTPGRRMAVPLVSARLLSEKVPRDLYPVMHIGDEPYRLLTTDMTSVPATVI
GEEVADLSLRENDIKNAINLMFRGI

>Doc

MTLQLISAEIIIQFHDRLLRVTPGVTGMPDPGRAEALMYRVLKQIEYEGVTDVWLLAAMHLLAISRGHIFNDGNK
RTALFITLLFLKRNIGISLAANPDFVDMTVDAAAGRLTLEQIAVRLRA

>HigB

VGSSLEDLLAFPITVRKAVGYQLHKIQYGIEPDDWKPFPSEIGAGVNEIRIRDNNGIYRVMYVAKFEEALYVLHSFQK
QTQQT SQHDKNIARTRYNRVVQRRNSL

>Hok

MPQRTFLMMLIVICVTILCFVWMVRDSLCLRLQQGNTVLVATLAYEVKR

>lbsA

MMHQV I I I I I I I I I I S F A A Y

>lbsB

MWLNVRSEGKGGFLLPLVS

>LdrA

MTLTQLGVVFWHDLAAPIIAGIIASVIVNWLDRK

>LdrB

MTLELSITIWHDLAAPTLVGIATGLFLGWWHRRK

>ParE

MVKLTPKASEDLENIWHYGWQHFGIEIQADRYINHLSIEIFSIMSANNIGTPRPELGEYIYALPFKRHIIFIQSVTEVIV
IRILSQNQDAGKHVNWL

>PasT

VVLFTRFMLMGIAMPQISRTALVPYSAEQMYQLVNDVQSYPQFLPGCVGSRVLESSPAQMTAAVDVSKAGISKT
FTTRNQLTRNQSILMHLVDGPFKKLIGGWKFTPLSPEACRIEFQLDFEFTNKLIELAFGRIFKELASNMVQAFTVRA
KEYRAG

>RelE

MTYKLA FNESALKEWKKLGHTIQEQFKKKLRERLENPRVPASQLHGRKDQYKIKLRGAGYRLVYSVEDEIITVTVIG
VGKRENDAVYKMTRHRS

>RelE2

MTYELEFDPRALKEWHKLGDTVKAQLKKKLADVLLNPRIDSARLNGLPDCYKIKLKSSGYRLVYQVRDDVVIVFVW
AVGKREHSAVYHDANKRL

>RelE3

MRTFKTRWFNREAKPHTIKDDELSEAINAVLQ GKADNLGGGVYKKRLNQRDRAIVLAKGGEHWFYTFLYAKQ
DMANISYRELAGFRELAHYACLTEDQITALINNKELVEVRHVSKN

>RelE4

MMEIFWTMLASQDRKRIREYIAEQNLMAAIELDERIGYSASSLAGQPYKGRNGRVEGTRELVIHPHFVLVYEVDS
QWGKVYILRVLHTAQKWP

>SehA

VHVISRKPFNEAMLMYPNHELALTELLNVLEKKTFTQPEEMKRYIPSLDNFKYRDKWWVIDVSGNSLRLLISYIDFRL
HKIFVKHIVSHA EYDKLTAYYRGNKE

>SehD

MDKVLFERLTQSMSQMNEIIEGTREPSRTHIDAMKIKEIROQASGLSQSKFAELISVNVDTLRNWEQGRRSPTGPA
KALLRAIANDPRNVIQALRY

>ShpA

MPMEFEWDANKAKSNLRKHGVRFEDAVLVFDDPRHLRQERYENGEYRWQTLGLVHGIVVILVAHSVRFESGF
EVIRIISARKADRKERNRYEHG

>SymE

MTTVHSIADPCDPEVSPTNNRHLLTVSYASRYDPYTRIPALTMKGQWLEAAGFATGTEVDVVRVMNGCIVLTAQQP
QPPEEELMQSLRQVSKLSARKQKQVQAFIDVMAGSK

>T1

MKRLRSKMTTEELAECGLVARQTVNRWIREQHWKTEKFPGVKGGRRARLIHIDASVREFILNIPAFRKLPAFYQAE
AFAEYANAASHAYRQIIDAVENMSAQEQEKLALFLSREGIRGFLTRLGINEAD

>T2

MMFTDWHEAAIGKTHNRMNFCGDADLNQFLQRHARQNHEKGTTKTYVALDNSDVTRIHGFYSVSPASLIYA
QVPGAISKGLGRYDVPVFRGLRLAVDKSMQGGGLGAQLLSAGKRCIQAALQVGGVALLIDAKNKQVCDWYKG
FGAVPLNDQPLSLLLSFKTLYAALSASGRL

>T3

MSDKFGEGRDPYLYPGLNVMRNRLGIHQARLAQAAYEMTALRAATIELGPLVRGLPHLCAIHRQLYQDIFDWA
GQLREVDIYQGDTRFCHFAYIEKEGNALMQDLEEEGYLVGLAHEKFVERLAHYCEINVLHPFRFGSGLAQRIFFE
QLALHAGYALSQQIAVETWKQANQSGAMGDLSALRAIFQKAISEARETE

>T4

VGRVTAPEPLSAFHQVAEFVSGEAVLDDWLKQKGLKNQALGAARTFVVCCKDKTKQVAGFYSLATGSVNHTTEAT
GNLRRNMPDPIPVILARLAVDLSFHGKGLGADLLHDAVLRVVAENIGVRAIMVHALTEEAKNFYIHHGFKSSQ
TQQRTLFLRLPQ

>T5

MISTPEPLHAGHILTPFCCGVDSIDNWLEQRAMKNQTTGASRTFVCCGSDSNVLAYYSLASSAVTTNTSPGRFRR
NMPDPIPVVVLGRLAVDKSLHGQGVARALVRDAGLRVIQVAETIGIRGMLVHALSDEAREFYQRVGFVPSPMDP
MMLMVTLGDLVESV

>TisB

MSVVDITILILKLIVAALQLLDAVLKYLK

>VapC

MLKFMLDTNTCIFTIKNKPEHIRERFNLNTRMCISSITLMELIYGAEKSLAPERNLAVVEGFISRLEVLDTQAAIH
TGQIRAEALARKGTPVGPYDQMIAGHAGSRGLVVVTNNLREFERIPGIRIEDWC

>VapC2

MLKFMLDTNICIFTIKNKPASVRERFNLNQGRMCISSVTLMELIYGAEKSQMPERNLAVIEGFVSRLDVLDYDTPA
ATHTGQIRAEARQGRPVGPFQMIAGHARSRLIVVTNNTREFERVGGRLRTEDWS

>YafQ

MGQREIEYSGQFQKDVKRAQKRHKDVGKLTLLIHHFPPLPAIYKDHLPLQGSYSYGRDAHIEPDWILYKITDE
CLRFERTGTHADLF

