

**Análisis del control transcripcional al operón
de virulencia *mgtCBR* de *Salmonella*, usando un
transportador de Mg^{2+}**

María Belén Torres Ojeda

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2018

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Análisis del control transcripcional al operón de virulencia *mgtCBR* de *Salmonella*, usando un transportador de Mg^{2+}

Proyecto Especial de Graduación presentado como requisito parcial para optar al título de
Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

María Belén Torres Ojeda

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2018

Análisis del control transcripcional al operón de virulencia *mgtCBR* de *Salmonella*, usando un transportador de Mg^{2+}

María Belén Torres Ojeda

Resumen. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, es una bacteria causante de enfermedades transmitidas por alimentos como gastroenteritis o enterocolitis. Se propaga principalmente a través de pollos, huevos y excrementos fecales. Es posible eliminar el patógeno al cocinar correctamente los alimentos y purificar los suministros de agua. Estudios previos sobre la genética de *Salmonella* mostraron que a menor transcripción del operon *mgtCBR*, disminuye su resistencia al calor y la capacidad de virulencia. Por tal razón, el presente estudio buscó: (i) evaluar la regulación transcripcional de los genes de transporte de Mg^{2+} en *Salmonella* Typhimurium, y (ii) analizar la regulación transcripcional de los genes de transporte de Mg^{2+} después de la introducción de la mutación S88L-*trmD* en tres cepas diferentes de *Salmonella*. El estudio se realizó en el Centro de Investigación de Cáncer, en la Universidad de Purdue. En la primera fase del estudio se evaluó la transcripción de *mgtB* en una cepa control y tres cepas que albergan una mutación puntual en los factores de traducción [*rmpA* (G23A), Δ *rpmE*, S88L-*trmD*] usando células cultivadas en altas [1.6 mM] y bajas [0.016mM] concentraciones de Mg^{2+} . Una de estas mutaciones genéticas (S88L-*trmD*) redujo la transcripción del gen *mgtB*; por tal motivo, en la segunda etapa del estudio, la mutación se introdujo en nuevas cepas y su efecto se comparó con la cepa parental. Como resultado, se encontró que, de hecho, la mutación S88L-*trmD* disminuye la transcripción de *mgtB*.

Palabras clave: Homeóstasis de Mg^{2+} , metiltransferasa, termo-tolerancia, transcripción genética.

Abstract. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, is a bacterium that causes foodborne diseases such as gastroenteritis or enterocolitis. It is spread mainly through chickens, eggs and fecal shedding, and it is possible to eliminate the pathogen by correctly cooking food and purifying water supplies. Previous studies on the genetics of *Salmonella* showed that a lower transcription of the *mgtCBR* operon, decreases its heat resistance and virulence capacity. For this reason, the present study sought to (i) evaluate the transcriptional regulation of Mg^{2+} transport genes in *Salmonella* Typhimurium, and (ii) analyze the transcriptional regulation of Mg^{2+} transport genes after introducing the S88L-*trmD* mutation, into in three different strains of *Salmonella*. The study was conducted at the Center for Cancer Research, at Purdue University. For the first phase of the study, the transcription of *mgtB* was evaluated in a control strain and three strains harboring a deletion or point mutations in translation factors [i.e. *rpmA* (G23A), Δ *rpmE*, S88L-*trmD*] using cells grown in media containing high [1.6mM] and low [0.016mM] Mg^{2+} concentrations. One of these genetic mutations (i.e. S88L-*trmD*) reduced the transcription of the *mgtB* gene; for this reason, in the second stage of the study, the mutation was introduced into new strains and its effect was compared with the parental strain. As a result, the S88L-*trmD* mutation was found indeed, to decreases the transcription of the *mgtB* gene.

Key words: Gene transcription, methyltransferase, Mg^{2+} homeostasis, thermo-tolerance

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
4. CONCLUSIONES.....	13
5. RECOMENDACIONES.....	14
6. LITERATURA CITADA.....	15
7. ANEXOS	17

ÍNDICE DE CUADROS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Origen de la cepa madre.	3
2. Cepas utilizadas en la primera etapa.	4
3. Condiciones de ensayo β - galactosidasa.....	5
4. Cepas control utilizadas en la segunda etapa.	6
5. Cepas mutadas en la segunda etapa.....	7
6. Resultados de actividad enzimática (MU) de β -galactosidasa en células de <i>Salmonella</i> mutadas en presencia de diferentes concentraciones de Magnesio.	8
7. Resultados de actividad enzimática (MU) de β -galactosidasa en cepas de <i>Salmonella</i> TL 5762 (control) y TL6256 (mutación) en presencia de diferentes concentraciones de Magnesio.	9
8. Resultados de actividad enzimática (MU) de β -galactosidasa en cepas de <i>Salmonella</i> TL5360 (control) y TL6257 (mutación) en presencia de diferentes concentraciones de Magnesio.	10
9. Resultados de actividad enzimática (MU) de β -galactosidasa en cepas de <i>Salmonella</i> TL5358 (control) y TL6258 (mutación) en presencia de diferentes concentraciones de Magnesio.	10
Anexos	Página
1. Actividad de β -galactosidasa en fusiones transcripcionales del gen <i>mgtB-lacZ</i> en cepa control y en mutaciones <i>rpmA</i> (G23A), <i>rpmE::Cam</i> y S88L- <i>trmD</i>	17
2. Actividad de β -galactosidasa en fusiones transcripcionales en cepas control, y mutaciones de S88L <i>trmD</i>	17
3. Cuadro resumen de análisis estadísticos para primera fase.	18
4. Cuadro resumen de análisis estadísticos para segunda fase.	18
5. Resumen de presupuesto usado en el proyecto.	18

1. INTRODUCCIÓN

Se estima que cada año en los Estados Unidos, al menos 28,000 personas son hospitalizadas y otras 3,000 personas mueren por enfermedades transmitidas por los alimentos (CDC 2015). Uno de los microorganismos involucrados en enfermedades transmitidas por los alimentos es *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

Salmonella Typhimurium es una bacteria Gram-negativa, considerada un patógeno facultativo intracelular, cuyo hábitat es el tracto intestinal de animales y humanos (CDC 2015). Dicha bacteria está directamente asociada a una gran parte de los casos de personas que se enferman año a año en todo el mundo debido a la falta de seguridad alimentaria. La salmonelosis ocurre en humanos como gastroenteritis o enterocolitis, los síntomas generalmente pueden aparecer hasta 72 horas después de ingerir un alimento contaminado (FDA 2017).

Salmonella se clasifica en serotipos, lo que facilita el estudio y control de las infecciones causadas por el microorganismo. Sin embargo, conocer simplemente la estructura en la superficie de las bacterias no ha sido suficiente para reducir la incidencia de infecciones y es por eso que los científicos han decidido estudiar la estructura genética de las bacterias para de esta manera también, encontrar soluciones a la incidencia de enfermedades transmitidas por *Salmonella* (CFSPH 2005).

Para el estudio genético de microorganismos, su secuencia de genes está dividida en distintos operones; los cuales son agrupaciones o conjuntos de genes (Leonard *et al.* 2015). Estos operones son independientes unos de otros y a cada uno le corresponde una función específica dentro de la bacteria. El operón de virulencia *mgtCBR*, está formado por los genes *mgtB*, *mgtC* y *mgtR* (Lee *et al.* 2013). Sus funciones son la transcripción de Mg^{2+} para *mgtB*; *mgtC* es un factor de virulencia y *mgtR* es un péptido regulador (Miranda-CasoLuengo *et al.* 2017)

El locus del operón *mgtCBR* ha sido identificado como parte de una nueva isla de patogenicidad de *Salmonella*, SPI-3 (Lejona *et al.* 2003) (MoncriefandMaguireÇ. La transcripción de *mgtCBR* está regulada por Mg^{2+} extracelular a través del sistema regulador PhoPQ de dos componentes, importante para la virulencia (Monsieurs *et al.* 2005).

Salmonella Typhimurium expresa tres sistemas distintos de transporte de Mg^{2+} . Los locus genéticos para estos sistemas de transporte han sido designados como *corA*, *mgtA*, y *mgtB*. Los datos genéticos y de expresión sugieren que cada uno de los tres locus representan un sistema de transporte distinto capaz de soportar el movimiento de Mg^{2+} a través de la membrana (Payandeh *et al.* 2013).

El magnesio es importante para diferentes procesos celulares, incluyendo actividad enzimática, reacciones de fosforilación dependientes de nucleótidos trifosfato e integridad de macromoléculas y membranas (Ramírez *et al.* 2000, Laires *et al.* 2004). Además, la homeóstasis de Mg^{2+} también está asociada a la termotolerancia en el patógeno alimentario *Salmonella enterica*, ya que la supervivencia de este microorganismo a altas temperaturas puede ser exageradamente aumentada debido a la sobreproducción de las proteínas transportadoras de Mg^{2+} (O'Connor *et al.* 2009).

O'Connor *et al.* en 2009, reportaron en uno de sus estudios, que la transcripción incrementada de los genes de transporte de Mg^{+2} confiere un aumento de la termo tolerancia a *Salmonella*, mientras que la transcripción de *mgtA* y *mgtB* es inducida por el consumo de Mg^{2+} . En 2016, Gall identificó las siguientes mutaciones que confirieron la transcripción de alto nivel de *mgtA* a altas concentraciones de Mg^{2+} : (i) un cambio en pares de bases que introdujo un codón de Prolina adicional en *mgtL*, generando tres codones de prolina consecutivos; (ii) lesiones a *rpmA* y *rpmE*, que codifican las proteínas ribosómicas L27 y L31, respectivamente; (iii) delección de *efp*, que codifica el factor de elongación EF-P que ayuda a la traducción de codones de prolina; y (iv) una mutación sensible al calor en *trmD*, cuyo producto cataliza la metilación m¹G37 de tRNA^{Pro}.

El Mg^{2+} es un factor importante para la regulación de virulencia y termotolerancia en *Salmonella enterica*; es por eso que en esta investigación se busca analizar el efecto que tienen las distintas concentraciones de Mg^{2+} en distintas cepas de *Salmonella*, estableciendo los siguientes objetivos:

- Evaluar la regulación transcripcional de los genes reguladores de Mg^{2+} en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium aplicando en el ensayo de β -galactosidasa.
- Analizar la regulación transcripcional de los genes de transporte de Mg^{+2} después de la introducción de la mutación S88L-*trmD* en tres cepas diferentes de *Salmonella*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación.

El experimento completo con el ensayo de β -galactosidasa se llevó a cabo en el laboratorio N° 325, a cargo del profesor Laszlo Csonka, Ph.D., ubicado en el Center for Cancer Research, Purdue University, en los Estados Unidos.

Cepas bacterianas.

Todas las cepas de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium usadas en este experimento se derivaron de la cepa TL 1. El origen de la cepa madre se observa en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Origen de la cepa madre.

Nombre	Genotipo	Referencia
TL1	Csonka lab line of wild-type <i>S. Typhimurium</i> LT2	De J.L. Ingraham

Bacteriófago P22.

El bacteriófago utilizado para este proyecto fue P22 debido a que puede transferir ADN de una bacteria huésped de *Salmonella* a otra, a través de la transducción. Con el Fago P22 se puede transmitir mutaciones de la cepa donante a la cepa receptora, seleccionando resistencia a antibióticos u otros fenotipos identificables.

Primera fase.

Durante la primera fase del experimento se estudió el efecto de tres cepas distintas con tres mutaciones genéticas diferentes, en la transcripción de Mg^{2+} . Dichas cepas fueron mutadas anteriormente en experimentos previos. Como se describe en el Cuadro 2, la cepa TL 5354 se construyó mediante el crecimiento del Fago P22 en la cepa donante TL 5352 y se realizó una transducción en la cepa receptora TL1, seleccionando el fenotipo Km^R y heredando o reteniendo [Cm^S , Lac^-] como fenotipos no seleccionados.

Para las cepas TL 5350, TL 6254 y TL 6255, se usó el bacteriófago P22 y la cepa donante fue TL 4646. Para la transducción, se usó las cepas TL 4794, TL 5700 y TL 5853, como cepas receptoras de las mutaciones *rpmA*, *rpmE* y *S88L-trmD* respectivamente. En la primera etapa del experimento, el control transcripcional de Mg^{2+} se evaluó con ayuda del ensayo de β -galactosidasa exactamente como el método de Miller (Miller 1992).

Para esto, se inocularon las bacterias a evaluar en 1 ml de caldo LB (Luria Bertani) y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. A la mañana siguiente, se transfirieron 20 μ l de

los cultivos en 2 ml de medio M63 + Glucosa [10 mM] + Mg^{2+} ([0.016 mM] y [1.6 mM] para los tratamientos de alta y baja concentración de Mg^{2+}) y se incubaron los nuevos cultivos a 37°C por 8 horas. Posterior a esto, al cumplir ocho horas de incubación, se transfirieron 80 μ l de los cultivos en 2 ml de su respectivo medio M63 + Glucosa [10 mM] + Mg^{2+} [0.016 mM] y [1.16 mM] Mg^{2+} , individualmente y se incubaron todas las cepas a 37 °C durante toda la noche.

Cuadro 2. Cepas utilizadas en la primera etapa.

Nombre	Genotipo	Construcción
TL 5354	<i>mgtB12::MudJ</i>	P22 (TL 5352) $\rightarrow$ TL 1 = Km^R [Cm^S , Lac^-]
TL 5350	<i>mgtB12::MudJ</i> <i>rpmA</i> (G23A) up- 9251:: Cam^R	P22 (TL 4646) $\rightarrow$ TL 4794 = Km^R [Cm^R , Lac^+]
TL 6254	<i>mgtB12::MudJ</i> $\Delta rpmE::Cam$	P22 (TL 4646) $\rightarrow$ TL 5700 = Km^R [Cm^R , Lac^-]
TL 6255	<i>mgtB12::MudJ</i> S88L- <i>trmD</i>	P22 (TL 4646) $\rightarrow$ TL 5853 = Km^R [Cm^R , Lac^-]

Km^R : resistente a kanamicina; Cm^S : sensible a cloranfenicol; Lac^- : no puede fermentar lactosa; Lac^+ : puede fermentar lactosa.

Para continuar con el experimento y dar inicio a la reacción, los compuestos ONPG ortho-Nitrophenyl- β -galactoside (4 mg/ml) y Buffer Z fueron aclimatados a temperatura ambiente.

Preparación de células.

Se añadió 1.5 ml de los cultivos incubados la noche anterior en cada micro tubo correspondiente y se centrifugó durante 3.5 min a una velocidad de 15000 rpm en la centrífuga ubicada en el refrigerador a 4°C. Una vez centrifugados los cultivos, se desechó el sobrenadante de los micro tubos y se re suspendió la bacteria en 1.5 ml de Buffer Z ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ [40 mM] + $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ [60 mM] + KCl [10 mM] + $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ [1mM] + 2.7mL of 2-Mercaptoethanol [50 mM] + H_2O).

Se transfirieron 0.6 ml de las células en los nuevos micro tubos; se permeabilizó esta solución, añadiendo 100 μ l de $CHCl_3$ (cloroformo) y 100 μ l de SDS (dodecilsulfato sódico). También se agregaron 0.8 ml de Buffer-Z y se agitó en el vortex durante un minuto. Finalmente, se dejó reposar la solución por 5 min.

Antes de iniciar la reacción, se midió el OD_{600} del contenido restante 0.9 ml de células, usando Buffer- Z como blanco. Para esto, se vertió el contenido de los micro tubos en cubetas de 10 mm x 10 mm x 45 mm con capacidad máxima de 3 ml. El espectrofotómetro utilizado fue Shimadzu UV-1650PC UV/Vis.

Preparación de las condiciones del ensayo.

Se transfirió la cantidad de volumen indicada de la capa superior de los micro tubos permeabilizados en nuevos micro tubos enumerados previamente de izquierda a derecha, los cuales contenían una cantidad indicada de Buffer- Z (Cuadro 3).

Cuadro 3. Condiciones de ensayo β - galactosidasa

Células permeabilizadas (μ l)	Buffer-Z (ml)
50	0.95
100	0.90
200	0.80

Las distintas concentraciones de solución mostradas, hacen referencia a un control que se lleva con respecto a la reacción; es decir, los datos obtenidos con Densidad Óptica deben tener una relación de secuencia entre las tres concentraciones.

Ensayo β -galactosidasa.

Se apuntó la hora de inicio de la reacción. Para empezar la reacción se agregaron 170 μ l de ONPG (4 mg/ml), para llevar un orden específico y evitar errores posteriores en la lectura de datos, es necesario agregar a solución de izquierda a derecha y a la misma velocidad. Una vez agregado el ONPG en todos los micro tubos, se cerraron y se invirtieron de una a dos veces.

Se esperó a que el contenido en los micro tubos se tornara amarillo ya que este es el indicativo de que la enzima actúa y que es momento de detener la reacción. Para esto, se agregaron 430 μ l de NaCO_3 1M. Se invirtieron los tubos de una a dos veces y se centrifugó a 15000 rpm por 1.5 minutos usando la centrífuga ubicada en el refrigerador a 4 °C.

Finalmente, se midió el OD_{420} de cada micro tubo, usando Buffer- Z como blanco. Nuevamente se vertió el contenido de los micro tubos en cubetas y luego se midió la densidad óptica en el espectrofotómetro. Para calcular las unidades de actividad enzimática se utilizó la ecuación [1].

$$\text{Actividad de } \beta\text{- galactosidasa (M.U)} = (1000) * \{ [\text{OD}_{420}] / [(T * V) * (\text{OD}_{600} / 2.5)] \} \quad [1]$$

Donde:

OD_{420} = densidad óptica a una longitud de onda de 420 nm

T = tiempo que tarda en actuar la enzima (minutos)

V = factor de dilución (ml)

OD_{600} = densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm

1.5 = factor de dilución en relación a la cantidad añadida de Buffer Z

Después de obtener los datos de actividad enzimática, se realizó un análisis de los mismos. El cual consistió en obtener un promedio de los datos, calcular error y desviación estándar de cada cepa utilizada en la primera fase. Con esta información se realizaron gráficas

estadísticas que demuestran diferencias en la transcripción del operón de virulencia *mgtCBR* entre las distintas cepas.

Segunda fase.

De acuerdo a los datos obtenidos previamente en la primera fase, se decidió continuar el experimento, analizando si la mutación genética (S88L-*trmD*) tiene el mismo efecto de apagar el operón de virulencia en tres nuevas cepas. Las cepas utilizadas en esta etapa fueron las que se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 4. Cepas control utilizadas en la segunda etapa.

Nombre	Genotipo	Construcción
TL 5762	<i>mgtM1 mgtB12::MudJ</i>	P22 (TL 4648) → TL 1 = Km ^R [Lac ⁺]
TL 5360	<i>mgtM2 mgtB12::MudJ</i>	P22 (TL 5352) → TL 5242 = Km ^R [Cm ^S , Lac ⁺]
TL 5358	<i>mgtM2.4 mgtB12::MudJ</i>	P22 (TL 5352) → TL 5241 = Km ^R [Cm ^S , Lac ⁺]

Km^R: resistente a kanamicina; Cm^S: sensible a cloranfenicol; Lac⁺: puede fermentar lactosa

Para la construcción de la cepa TL 5762, el fago P22 creció en la cepa donante TL 4648 y se realizó una transducción en la cepa receptora TL1, seleccionando el fenotipo Km^R y heredando o reteniendo [Lac⁺] como fenotipos no seleccionados. Por otro lado, para las cepas TL 5360 y TL 5358, el fago P22 creció en TL 5352, en ambos casos, y la cepa receptora para realizar la transducción fue TL 5242 y TL 5241 respectivamente. La selección fenotípica de ambas cepas fue Km^R, y heredaron [Cm^S, Lac⁺].

Lisado P22 de bacteria donante.

Se inoculó la cepa de interés en 1ml de caldo LB y se incubó el cultivo a 37 °C durante ocho horas. Luego se añadió 100 µl de la bacteria donante en 1ml de Buffer P22 (el cual estuvo almacenado en el refrigerador a 4 °C). Se incubó la mezcla a 37 °C durante toda la noche.

A la mañana siguiente se transfirió la solución de bacteria/P22 a micro tubos, se agregó 100 µl de CHCl₃ (cloroformo), se agitó durante dos minutos en el vórtex y se centrifugó a 15,000 rpm por 3.5 min en la centrifuga ubicada en el refrigerador a 4 °C. Para finalizar, se transfirió el P22 sobrenadante (la capa superior) a un nuevo micro-tubo y se almacenó en el refrigerador a 4 °C.

Transducción de P22.

Se inocularon las cepas de interés de la bacteria receptora en 1 ml de caldo LB y se incubaron los cultivos a 37 °C durante ocho horas. En nuevos micro tubos se añadió 1, 10 y/o 100 µl del Lisado P22 Donante a 100 µl de cada cultivo de las cepas receptoras. Se

incubó la mezcla a 37 °C por aproximadamente 60 ± 15 min. Finalmente, se inoculó cada mezcla en platos Petri con medio LB y se incubó a 37 °C durante toda la noche.

Luego de realizar las respectivas transducciones, se crearon tres nuevas cepas de *Salmonella*, las cuales se describen a continuación en el Cuadro 5. Para la creación de las nuevas cepas, TL 6256, TL 6257 y TL 6258, el fago P22 fue introducido en la cepa donante TL 7497. Para la transducción se utilizaron tres cepas receptoras distintas para cada cepa donante. Éstas cepas receptoras son las mismas mostradas en el Cuadro 4, las cuales fueron utilizadas como wildtypes en la segunda fase del experimento. La selección fenotípica final para TL 6256 y TL 6257 fue Cm^R, y heredaron [Km^R, <Lac⁺]. Mientras que para TL 6258, la selección fenotípica fue Cm^R y heredó [Km^R, Lac⁻].

Cuadro 5. Cepas mutadas en la segunda etapa

Nombre	Genotipo	Construcción
TL 6256	<i>mgtM1</i> <i>mgtB12::MudJ</i> S88L- <i>trmD</i>	P22 (GT 7497) → TL 5762 = Cm ^R [Km ^R , <Lac ⁺]
TL 6257	<i>mgtM2</i> <i>mgtB12::MudJ</i> S88L- <i>trmD</i>	P22 (GT 7497) → TL 5360 = Cm ^R [Km ^R , <Lac ⁺]
TL 6258	<i>mgtM2.4</i> <i>mgtB12::MudJ</i> S88L- <i>trmD</i>	P22 (GT 7497) → TL 5358 = Cm ^R [Km ^R , Lac ⁻]

Km^R: resistente a kanamicina; Cm^R: resistente a cloranfenicol; Lac⁻: no puede fermentar lactosa.

Una vez realizada la transducción para las tres nuevas cepas, se continuó el experimento, como en la primera etapa, el control transcripcional de Mg²⁺ se evaluó con ayuda del ensayo de β-galactosidasa exactamente como el método de Miller. Para esto, se inocularon las bacterias a evaluar en 1ml de caldo LB y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. A la mañana siguiente, se transfirieron 20 µl de los cultivos en 2 ml de medio M63 + Glucosa + bajo (0.016 mM) y alto (1.6 mM) Mg²⁺ y se incubaron los nuevos cultivos a 37 °C por ocho horas. Luego del tiempo de incubación, se transfirieron 80 µl de los cultivos en 2 ml de su respectivo medio M63+ Glucosa+ bajo (0.016 mM) y alto (1.16 mM) Mg²⁺ y se incubaron todas las cepas a 37 °C durante toda la noche.

Para continuar con el experimento, fue necesario sacar del congelador, a -20 °C, el ONPG (4 mg/ml) y el Buffer Z del refrigerador a 4 °C. Se dejaron ambos compuestos a temperatura ambiente y se cubrió el ONPG, ya que este compuesto es sensible a la luz.

Ensayo β-galactosidasa.

Se realizó el ensayo de β-galactosidasa tal y como se describe en la primera fase (Miller 1992). Posterior a la obtención de los resultados de actividad enzimática, se realizó un análisis de datos. Dicho análisis consistió en obtener un promedio de los datos, calcular error y desviación estándar de cada cepa utilizada en la primera fase. Con esta información se realizaron gráficas estadísticas que demuestran diferencias en la transcripción del operón de virulencia *mgtCBR* entre las distintas cepas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primera fase.

La actividad enzimática de β -galactosidasa en la cepa Wildtype es 43 veces más elevada en bajas concentraciones de Mg^{2+} . Esto ocurre debido a que a altas concentraciones de Mg^{2+} , las células no requieren una producción elevada de la enzima para transportar el Mg^{2+} . Por otro lado, cuando las células perciben concentraciones limitadas de Mg^{2+} la actividad enzimática aumenta para aprovechar el Mg^{2+} disponible en el medio y sobrevivir (Cuadro 6).

Cuadro 6. Resultados de actividad enzimática (MU) de β -galactosidasa en células de *Salmonella* mutadas en presencia de diferentes concentraciones de Magnesio.

Cepa	Mg^{2+} [1.6 mM]	Mg^{2+} [0.016 mM]
TL 5354 (Control) <i>mgtB12::MudJ</i>	2.20 ± 0.39 ^{b X}	88.97 ± 19.37 ^{c Y}
TL 5350 <i>mgtB12::MudJ rpmA</i> (G23A) up-9251::Cam ^R	37.56 ± 6.20 ^{a X}	181.07 ± 24.18 ^{a Y}
TL 6254 <i>mgtB12::MudJ</i> $\Delta rpmE::Cam$	4.36 ± 0.41 ^{b X}	98.41 ± 20.16 ^{b Y}
TL 6255 <i>mgtB12::MudJ S88L-trmD</i>	4.38 ± 0.55 ^{b X}	9.58 ± 3.52 ^{d X}

Los valores representan el promedio de 12 observaciones $\pm$ la desviación estándar.

^{a-d} Letras minúsculas diferentes indican diferencias entre cepas ($P \leq 0.05$)

^{X-Y} Letras mayúsculas diferentes indican diferencias entre concentraciones de Mg^{2+} ($P \leq 0.05$)

La cepa TL5350 (*rpmA*(G23A)) en comparación con la cepa Wildtype (TL5354) incrementa su actividad enzimática en ambas concentraciones de Mg^{2+} . Por otro lado, en la cepa TL6254 (*rpmE::Cam*) no hay un cambio en la actividad enzimática en ambas concentraciones. Esto significa que probablemente las mutaciones alteran la formación de enlaces peptídicos; por lo tanto, la traducción de *mgtB* se ve alterada (Gall et al. 2016).

En el caso de la cepa TL6255 (S88L- *trmD*), en altas concentraciones de Mg^{2+} nuevamente se observa un cambio en la actividad de β -galactosidasa. Sin embargo, en bajas

concentraciones de Mg^{2+} , la actividad enzimática se ve nueve veces reducida. La posible razón a esto, es que S88L-*trmD* es la única mutación de metiltransferasa que requiere Mg^{2+} para su activación, lo que significa que, a menores concentraciones del mismo, su actividad enzimática será menor.

La actividad enzimática de las cepas de *Salmonella* utilizadas está relacionada directamente con la transcripción genética del operón *mgtCBR*. Lo cual significa que al aumentar la actividad de β -galactosidasa, también se incrementa la transcripción genética de *mgtCBR*. Este operón está asociado directamente a la capacidad de virulencia de *Salmonella* (*mgtC*), y a la resistencia térmica (*mgtB*). Por lo tanto, al elevarse la transcripción genética, la capacidad de virulencia y resistencia térmica aumentan. Aunque esta asociación directa ha sido confirmada en estudios previos, no está por demás, realizar una evaluación de termo tolerancia y capacidad de virulencia.

En base a los resultados expresados en la primera etapa, se tomó como cepa de interés a TL6255 para replicar la mutación (S88L-*trmD*) y evaluar nuevamente la actividad enzimática de otras cepas con su respectivo control.

Segunda fase.

Con los datos obtenidos en la primera fase, se decidió utilizar la cepa TL 6255 para replicar la mutación genética de interés (S88L-*trmD*) e introducirla en tres nuevas cepas. En el Cuadro 7 se muestra la cepa TL 5762 como cepa original o control y la cepa TL 6256 como la cepa mutada con S88L-*trmD*. En los siguientes resultados se observa que hubo diferencia significativa en la actividad enzimática de β -galactosidasa. Esta actividad enzimática se reduce notablemente en ambas concentraciones de Mg^{2+} . Lo que verifica que la mutación S88L-*trmD* reduce la transcripción del operón *mgtCBR*.

Cuadro 7. Resultados de actividad enzimática (MU) de β -galactosidasa en cepas de *Salmonella* TL 5762 (control) y TL6256 (mutación) en presencia de diferentes concentraciones de Magnesio.

Cepa	Mg^{2+} [1.6 mM]	Mg^{2+} [0.016 mM]
TL 5762 (Control) <i>mgtM1 mgtB12::MudJ</i>	139.76 $\pm$ 4.66 ^{b X}	277.71 $\pm$ 14.09 ^{a Y}
TL 6256 <i>mgtM1 mgtB12::MudJ S88L-trmD</i>	59.85 $\pm$ 12.03 ^{d X}	106.39 $\pm$ 31.84 ^{c Y}

Los valores representan el promedio de 9 observaciones $\pm$ la desviación estándar

a-d: Letras diferentes indican diferencias entre tratamientos ($P \leq 0.05$)

X-Y: Letras diferentes indican diferencias entre concentraciones de Mg^{2+} ($P \leq 0.05$)

El Cuadro 8 muestra los resultados de la comparación de la segunda cepa utilizada en esta fase, donde TL5360 es la cepa control y TL6257 es la cepa mutada con S88L-*trmD*. La cepa TL 5360 tiene una elevada actividad enzimática tanto en altas como en bajas

concentraciones de Mg^{2+} . Sin embargo, al introducir la mutación S88L-*trmD*, dicha actividad enzimática se ve reducida aproximadamente cinco veces para cada concentración de Mg^{2+} . Nuevamente se afirma que la mutación S88L-*trmD* reduce la actividad de β -galactosidasa, lo cual conlleva a que la transcripción del operón *mgtCBR* es reducida.

Cuadro 8. Resultados de actividad enzimática (MU) de β -galactosidasa en cepas de *Salmonella* TL5360 (control) y TL6257 (mutación) en presencia de diferentes concentraciones de Magnesio.

Cepa	Mg^{2+} [1.6 mM]	Mg^{2+} [0.016 mM]
TL 5360 (Control) <i>mgtM2 mgtB12::MudJ</i>	400.88 $\pm$ 34.05 ^{b X}	491.92 $\pm$ 79.56 ^{a X}
TL 6257 <i>mgtM2 mgtB12::MudJ</i> S88L- <i>trmD</i>	82.23 $\pm$ 10.91 ^{c X}	77.63 $\pm$ 18.87 ^{c X}

Los valores representan el promedio de 9 observaciones $\pm$ la desviación estándar

^{a-c}: Letras diferentes indican diferencias entre tratamientos ($P \leq 0.05$)

^{X-Y}: Letras diferentes indican diferencias entre concentraciones de Mg^{2+} ($P \leq 0.05$)

Finalmente, en el Cuadro 9 se observan TL5358 como cepa control y TL6258 como cepa mutada. De nuevo, la actividad enzimática en TL 5358 originalmente fue elevada para ambas concentraciones de Mg^{2+} . Pero una vez que la cepa fue mutada, TL 6258 demostró que la mutación S88L-*trmD* reduce notablemente la actividad enzimática tanto en altas como en bajas concentraciones de Mg^{2+} . Por lo tanto, la transcripción genética de *mgtB* también se aminora.

Cuadro 9. Resultados de actividad enzimática (MU) de β -galactosidasa en cepas de *Salmonella* TL5358 (control) y TL6258 (mutación) en presencia de diferentes concentraciones de Magnesio.

Cepa	Mg^{2+} [1.6 mM]	Mg^{2+} [0.016 mM]
TL 5358 (Control) <i>mgtM2.4 mgtB12::MudJ</i>	42.68 $\pm$ 8.37 ^{b X}	133.33 $\pm$ 47.67 ^{a Y}
TL 6258 <i>mgtM2.4 mgtB12::MudJ</i> S88L- <i>trmD</i>	16.08 $\pm$ 4.56 ^{c X}	45.20 $\pm$ 6.79 ^{b Y}

Los valores representan el promedio de 9 observaciones $\pm$ la desviación estándar

^{a-c}: Letras diferentes indican diferencias entre tratamientos ($P \leq 0.05$)

^{X-Y}: Letras diferentes indican diferencias entre concentraciones de Mg^{2+} ($P \leq 0.05$)

Como se observa en los resultados mostrados previamente, las cepas control usadas en la segunda etapa del experimento presentan alta actividad enzimática de β -galactosidasa. Una vez mutadas, dicha reacción enzimática se reduce. Lo que confirma nuevamente que la

mutación S88L-*trmD* reduce la actividad de β -galactosidasa, por ende la transcripción del operón de virulencia *mgtCBR* también se ve reducida.

Salmonella es la causa principal de infecciones transmitidas por alimentos en los Estados Unidos (CDC 2015). Y debido a que en la industria alimentaria lo más utilizado para inactivar este patógeno es el uso de temperatura, es importante comprender los mecanismos de termo resistencia de esta bacteria para aplicaciones en la inocuidad de alimentos.

La resistencia térmica en una bacteria puede ser regulada por factores como pH (Alvarez-Ordóñez *et al.* 2008) y por factores ambientales como actividad de agua. También, según estudios realizados por Hengge *et al.* en 1993, la osmolaridad en bacterias puede mejorar la termo-resistencia mediante el aumento del límite superior de temperatura de crecimiento y aumentado su viabilidad a temperaturas elevadas.

Basándose en el estudio mencionado anteriormente, O' Connor *et al.* evaluaron en el 2009 el control osmótico en la termo-tolerancia y se encontró la mutación chr-1 (constitutively heat resistant) la cual mostró una alta transcripción del gen *mgtA* (un transportador de Mg^{2+}). En dicho estudio se reveló una función hasta el momento desconocida del Mg^{2+} en la termo resistencia.

En el presente estudio se tomó en cuenta que MgtA y MgtB en *Salmonella* Typhimurium son parientes. Sus propiedades de transporte no son fuertemente diferentes. El gen *mgtA* es el transportador endógeno de Mg^{2+} ; mientras que *mgtB* es un gen extraño perteneciente al operón *mgtCBR* llevado en la isla de patogenicidad (SP-3) en *Salmonella* (Kehres and Maguire 2002)

En 2016, Gall *et al.* publicó un estudio donde encontró las tres mutaciones utilizadas en el presente documento [(*mgtB12::MudJ rpmA* (G23A) up-9251::CamR), (*mgtB12::MudJ Δ rpmE::Cam*) y (*mgtB12::MudJ* S88L-*trmD*)]. Estas cepas fueron creadas anteriormente para evaluar el comportamiento de las mismas en presencia de magnesio y encontrar el objetivo del mismo en la transcripción de *mgtA*. Las tres mutaciones fueron introducidas en la misma región genética, *mgtB::MudJ*.

La cepa TL6255 con la mutación *mgtB12::MudJ* S88L-*trmD*, fue la que destacó entre todas debido a que su actividad enzimática en bajas concentraciones de Mg^{2+} , se vio notablemente reducida. Las mutaciones condicionales sensibles a la temperatura son reactivos importantes para estudiar genes esenciales. El gen *trmD* es esencial para el crecimiento en bacterias debido a que codifica la enzima para convertir G37 a m1G37 en el lado 3' del anticodon de tRNA (Masuda *et al.* 2013).

Esta conversión implica la transferencia de metilo de la S-adenosil metionina y es fundamental para minimizar los errores de desplazamiento del ARNt en el ribosoma (Masuda *et al.* 2013). Hay una mutación puntual en el gen *trmD* que da como resultado una sustitución de aminoácidos de Serina en la posición 88 por Leucina. Esta mutación en la proteína hace que TrmD sea menos funcional a temperaturas superiores a 37 °C.

La utilización de vacunas para el control de las enfermedades infecciosas ha tenido un gran éxito para modificar los patrones de incidencia y mortalidad causada por las mismas. Sin embargo, todavía no existe una vacuna contra *Salmonella entérica* causante de cientos de infecciones y muertes al año. TrmD es una enzima importante y crítica para las bacterias; la cual es un objetivo para la medicina antimicrobiana de alta prioridad, debido a su importancia para el crecimiento de bacterias (Boyer *et al.* 1970-<2017>). La industria farmacéutica ha apuntado al estudio de TrmD; sin embargo, faltan estrategias para llevar a cabo dichos estudios. Una de las estrategias puede estar basada en datos de extensa enzimología y estudios de células, así como los mencionados en el presente documento. Por tal motivo, se considera que la información obtenida en este estudio aporta nuevos conocimientos a los campos de microbiología, ingeniería genética, inmunología, inmunogenética entre otros; los mismos que en conjunto podrían facilitar el estudio de TrmD para el desarrollo de nuevas vacunas que con el método tradicional no se han logrado realizar.

4. CONCLUSIONES

- La mutación más eficaz para reducir la transcripción del operón de virulencia *mgtCBR* estuvo en *trmD* independiente de la concentración de Mg^{2+} .
- La introducción de la mutación S88L-*trmD* en nuevas cepas de *Salmonella* a concentraciones altas y bajas de Mg^{2+} causó una reducción en la transcripción del operón de virulencia *mgtCBR*.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar el aislamiento de mutantes espontáneos para encontrar el locus de la mutación S88L-*trmD* en las nuevas cepas de *Salmonella*.
- Realizar ensayos de tolerancia térmica con las nuevas cepas mutadas para corroborar los resultados obtenidos en el presente estudio.

6. LITERATURA CITADA

Alvarez-Ordóñez A, Fernández A, López M, Arenas R, Bernardo A. 2008. Modifications in membrane fatty acid composition of *Salmonella typhimurium* in response to growth conditions and their effect on heat resistance. *Int J Food Microbiol.* 123(3):212–219. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.01.015.

Boyer PD, Krebs EG, Sigman DS, Tamanoi F, Dalbey RE, Hackney DD, Clarke SG, Koehler CM, Menon AK, Hall MN, et al. 1970-<2017>. *The Enzymes*. 3d ed. New York: Academic Press. volumes <1-38, 40>. ISBN: 978-0128117774.

[CFSPH] Center for Security and Public Health. 2005. Salmonellosis. Iowa, USA: Center for Security and Public Health. <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/disease.php?name=salmonella-nontyphoidal&lang=es>.

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2015. How Common is *Salmonella* Infection? [place unknown]: [publisher unknown]. <https://www.cdc.gov/salmonella/general/>.

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2015. *Salmonella* Atlas. 1600 Clifton Road Atlanta, GA 30329-4027 USA: Centers for Disease Control and Prevention; [updated 2015]. <https://www.cdc.gov/salmonella/reportspubs/salmonella-atlas/index.html>.

[FDA] Food and Drug Administration. s.f[2017]. Seguridad alimentaria para futuras mamás: Profesionales de la medicina - Los 14 patógenos principales transmitidos por los alimentos. 10903 New Hampshire Avenue: Food and Drug Administration; [updated 2017]. <https://www.fda.gov/Food/ResourcesForYou/HealthEducators/ucm091976.htm>.

Gall A, Datsenko Kirill, Figueroa N, Bossi L, Hou Y, Csonka L. 2016. Mg²⁺ regulates transcription of *mgtA* in *Salmonella Typhimurium* via translation of proline codons during synthesis of the MgtL peptide. *PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences)*. 113(52):15096–15101.

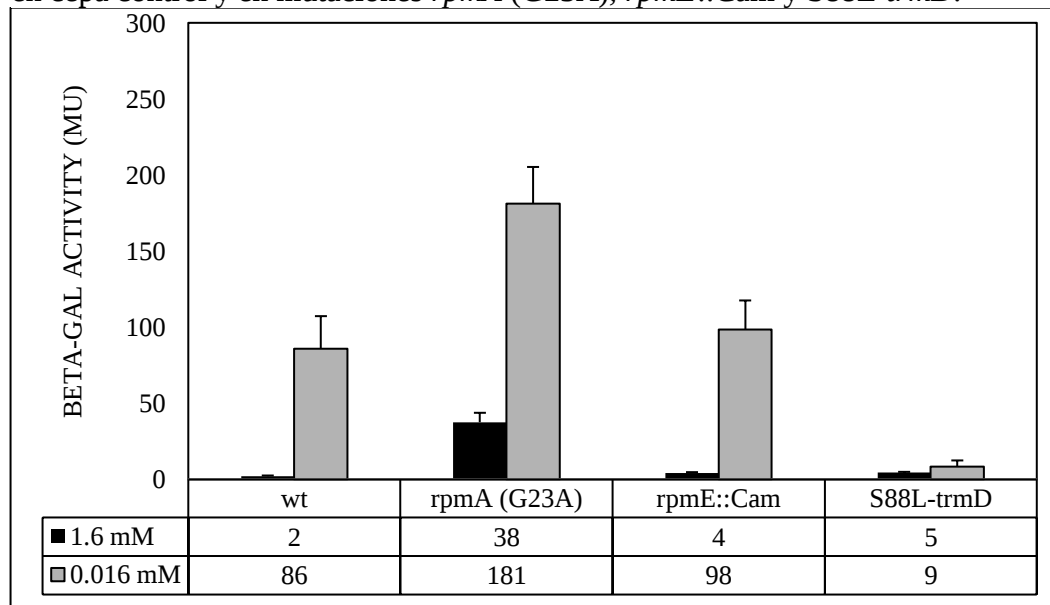
Hengge-Aronis R, Lange R, Henneberg N, Fischer D. 1993. Osmotic regulation of *rpoS*-dependent genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175(1):259–265. doi:10.1128/jb.175.1.259-265.1993.

Kehres D, Maguire Michael E. 2002. Structure, properties and regulation of magnesium transport proteins. *BioMetals*. 15:261–270. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1023/A:1016078832697.pdf>.

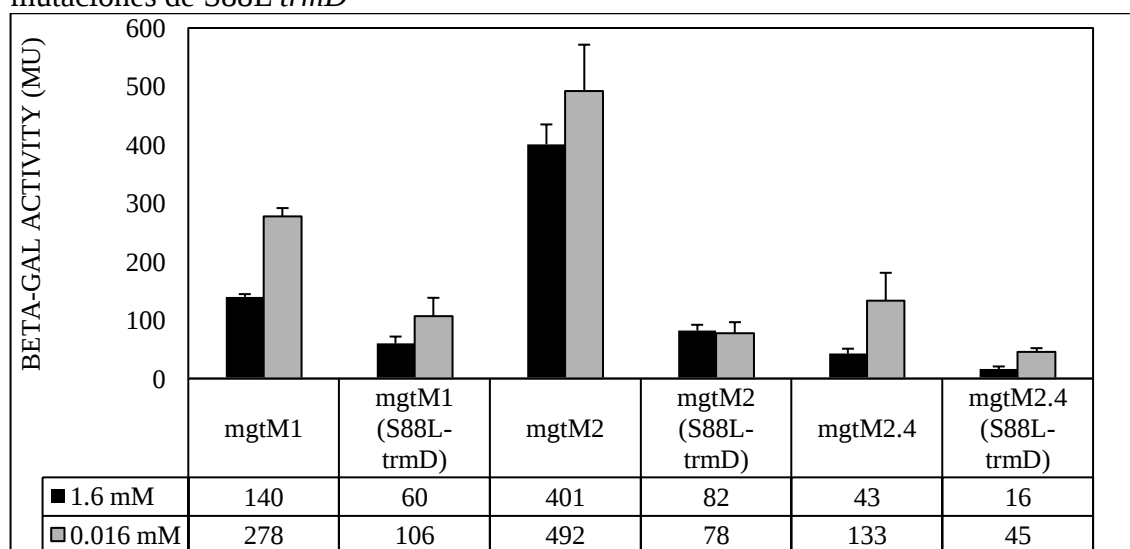
- Laires M, Monteiro C, Bicho M. 2004. Role of cellular magnesium in health and disease. *Frontiers in Bioscience*. (9):262–276.
- Lee E-J, Choi J, Groisman E. 2013. Control of *Salmonella* virulence operon by proline-charged tRNA^{Pro}. *PNAS(Proceedings of the National Academy of Sciences)*. 111(8):3140–3145.
- Lejona S, Aguirre A, Cabeza ML, García Vescovi E, Soncini FC. 2003. Molecular characterization of the Mg²⁺-responsive PhoP-PhoQ regulon in *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology*. 185(21):6287–6294.
- Leonard S, Lacher D, Lampel K. 2015. Acquisition of the *lac* operon by *Salmonella enterica*. *BMC Microbiology*. doi:10.1186/s12866-015-0511-8.
- Miller J. 1992. *A Short Course in Bacterial Genetics – A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria*. [place unknown]: [publisher unknown]. ISBN: 0-87969-349-5.
- Miranda-CasoLuengo AA, Kary SC, Erhardt M, Kröger C. 2017. Small RNA, Big Effect: Control of Flagellin Production. *Trends Microbiol*. 25(12):953–954. eng. doi:10.1016/j.tim.2017.10.003.
- Monsieurs P, Fang F, Navarre W, Bader M, Smet F de, Mc Clelland M, Fang F, Moor B de, Vanderleyden J, Marchal K. 2005. Comparison of the PhoPQ Regulon in *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*. *Journal of Molecular Evolution*. 462–474. doi:10.1007/s00239-004-0212-7.
- O'Connor K, Fletcher S, Csonka L. 2009. Increased expression of Mg²⁺ transport proteins enhances the survival of *Salmonella enterica* at high temperature. *PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences)*. 106(41):17522–17527.
- Payandeh J, Pfoh R, Pai E. 2013. The structure and regulation of magnesium selective ion channels. *BBA Biomembranes*. 1828(11):2278–2792. doi:10.1016/j.bbamem.2013.08.002.
- Ramírez P, Planells E, Llopis J. 2000. *Magnesio*. Universidad de Granada: [publisher unknown]. p. 91–100 (vol. 41) (1).

7. ANEXOS

Anexo 1. Actividad de β -galactosidasa en fusiones transcripcionales del gen *mgtB-lacZ* en cepa control y en mutaciones *rpmA* (G23A), *rpmE::Cam* y S88L-*trmD*.



Anexo 2. Actividad de β -galactosidasa en fusiones transcripcionales en cepas control, y mutaciones de S88L *trmD*



Anexo 3. Cuadro resumen de análisis estadísticos para primera fase.

	Source	F Value	Pr > F
Primera fase	Mg	484.84	<.0001
	Cepa	135.58	<.0001
	Mg*Cepa	47.25	<.0001

Anexo 4. Cuadro resumen de análisis estadísticos para segunda fase.

Segunda fase	TL5762 y TL6256	Source	F Value	Pr > F
		Mg	221.81	<.0001
		Cepa	411.27	<.0001
		Mg*Cepa	54.44	<.0001
	TL5369 y TL6257	Source	F Value	Pr > F
		Mg	2.93	0.101
		Cepa	734.6	<.0001
		Mg*Cepa	13.93	0.0012
	TL5358 y TL6258	Source	F Value	Pr > F
		Mg	57.61	<.0001
		Cepa	51.51	<.0001
		Mg*Cepa	14.44	0.0009

Anexo 5. Resumen de presupuesto usado en el proyecto.

Descripción	Total (\$)
Materiales y Reactivos	\$1,867.70
Costo total	\$1,867.70