



UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO
Facultad de Ciencias Biológicas
Doctorado en Biociencias Moleculares

**Caracterización bioquímica y funcional del sistema de dos componentes
ArcAB de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en respuesta a
condiciones de estrés oxidativo**

“Trabajo de titulación presentado al programa de Doctorado en Biociencias Moleculares,
Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Andrés Bello como parte de los requisitos
exigidos para optar al grado de Doctor en Biociencias Moleculares”

Por

EDUARDO HUGO MORALES SIERRA

Directora de Tesis: Dra. Claudia Saavedra S.

Laboratorio de Microbiología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas,
Universidad de Andrés Bello.

SANTIAGO-CHILE
Año 2013

RESUMEN

Salmonella enterica serovar Typhimurium es una bacteria Gram-negativo, anaerobio facultativo y patógeno intracelular que genera fiebre entérica en el modelo murino. Una vez ingerida por vía oral atraviesa el intestino y es internalizada por las células fagocíticas. En este lugar, es contenida en un fagosoma especializado denominado “vacuola contenedora de *Salmonella*”, donde se encuentra con una serie de compuestos antimicrobianos incluyendo las especies reactivas de oxígeno (ROS). Para sobrevivir, la bacteria ha generado diversos mecanismos de defensa que incluyen modulación de la producción de ROS, su degradación directa y cambios en la permeabilidad de su membrana externa. En este contexto, la expresión de diversos genes que codifican porinas se ve alterada en respuesta a ROS y adicionalmente presentan diversos sitios de unión para el regulador global ArcA. Esto nos llevó a la hipótesis de que “El sistema de dos componentes ArcAB detecta y responde a estrés oxidativo en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y produce cambios en la expresión génica para su supervivencia”.

Mediante la medición de los niveles de transcrito de los genes *ompD*, *ompW*, *ompS1* y *ompS2* y ensayos de cambio en la movilidad electroforética se demostró que el sistema de dos componentes ArcAB modulaba su expresión de manera directa en respuesta a ROS.

Una vez demostrado que el sistema participaba regulando la expresión génica en estas condiciones, se evaluaron cambios transcripcionales globales mediante hibridación en microarreglos. El análisis reveló que ArcA regula 58 genes en respuesta a H₂O₂ mientras ArcB 68 y que la regulación de cada miembro del sistema es independiente entre sí. ArcA regula la expresión de genes implicados en metabolismo central, síntesis de sideróforos, glutatión y nucleótidos. Por su parte, el rol de ArcB se asocia principalmente con la

regulación de la expresión de genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos. Análisis bioquímicos revelaron que ArcA es requerido para mantener un balance en los niveles de NADH, el pool de glutatión y los niveles de ROS intracelulares.

Finalmente, la medición de los niveles de transcrito de *arcA* y *arcB* y de sus productos génicos, además del uso de mutantes puntuales de la proteína ArcA y ArcB en los residuos implicados en la transferencia del grupo fosfato permitieron identificar los residuos necesarios para mediar la resistencia a H₂O₂ por cada uno de los miembros del sistema.

SUMMARY

Salmonella enterica serovar Typhimurium is a Gram-negative bacterium, facultative anaerobe and intracellular pathogen that generates enteric fever in the murine model. Once orally ingested it is internalized by phagocytic cells, where it is contained in a specialized compartment denominated the “*Salmonella* containing vacuole”, where it encounters a series of antimicrobial compounds including reactive oxygen species (ROS). In order to survive, *Salmonella* has generated several defense mechanisms including modulating ROS generation, its direct degradation and changes in outer membrane permeability. In this context, the expression of several genes coding porins is altered in response to ROS and present several binding sites for the global regulator ArcA. This leads to the hypothesis that “The ArcAB two-component system detects and responds to oxidative stress in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and generates changes in gene expression for its survival”.

By measuring the transcript levels of *ompD*, *ompW*, *ompS1* y *ompS2* and through electrophoretic mobility shift assays we demonstrated that ArcAB modulated their expression in response to ROS.

Once demonstrated that the system played a role in regulating gene expression under this condition, global transcriptional changes were evaluated by microarrays. The analysis revealed that ArcA regulates the expression of 58 genes in response to H₂O₂ while ArcB 68 and that the regulation of each member of the system was independent from its cognate partner. ArcA regulates the expression of genes implicated in central metabolism, siderophore, glutathione and nucleotide biosynthesis. On the other hand, ArcB is involved in regulating the expression of genes implicated in amino acid biosynthesis. Biochemical

analysis revealed that ArcA is required to maintain a balance in the levels of NADH, glutathione and intracellular ROS, in this way contributing to H₂O₂ resistance.

Finally, measurement of the transcript levels of *arcA* and *arcB* and of their gene products, together with the use of point mutants of the residues involved in the transfer of the phosphate group, allowed the identification of the residues required by each of the members of the system to mediate the resistance towards H₂O₂.