



PONTIFICIA UNIVERSIDAD
CATOLICA
DE VALPARAISO



UNIVERSIDAD TECNICA
FEDERICO SANTA MARIA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO
UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA

PROGRAMA CONJUNTO DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA

USM. BIBLIOTECA CENTRAL



3560900214386

Descripción, Caracterización y Proyección Biotecnológica de Genes Relacionados con la Virulencia en el Patógeno *Piscirickettsia salmonis*

**Tesis presentada para la obtención del Grado Académico
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA**

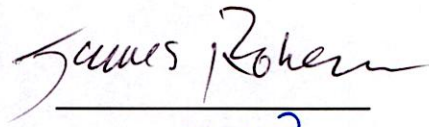
Alumno: **FERNANDO GÓMEZ CARMONA**
Profesor Guía: **DR. SERGIO MARSHALL**
Co-tutor: DRA. **CLAUDIA ALRAMIRANO**

DICIEMBRE, 2012.

**U.T.F.S.M.
BIBLIOTECAS**

COMISIÓN EVALUADORA INTEGRADA POR

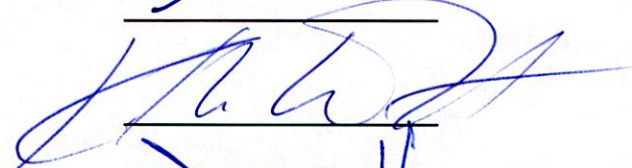
DR.: James Robeson Camus



DR.: Andrés Illanes Fontaura



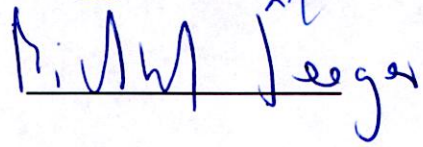
DR.: Kathleen Whitlock



DR.: Jaime Tobar



DR.: Michael Seeger Pfeiffer



A mis Padres, por su confianza e incondicional apoyo.

A mis amigos que siempre han estado conmigo, Alain, Carola, Carlos, Luis, Sandra, Tali, Nata, Pauli, Rafa, Nell y Andrea.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar al Dr. Sergio Marshall por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por haber confiado en mí en el desarrollo de este trabajo.

A Claudia Altamirano, por su apoyo y consejos para el desarrollo de este trabajo.

A Vitalia por su gran ayuda y paciencia.

Agradezco al Dr. Karl Klose de la Universidad de Texas (USA) por haberme recibido en su laboratorio para realizar la pasantía de tesis, por sus consejos y colaboración en el desarrollo del trabajo.

A Sandra, Carola y Luis por toda su ayuda y buena disposición.

A Patricio Cataldo, Andrea Peña y Ramón Ramírez por su constante apoyo y amistad.

A mis tías regalonas por su preocupación.

A todos los integrantes del Laboratorio por su ayuda y paciencia en todo momento (Jo, Maca, Ninoska, Carla, Nicolás, Cristián, Marisela, Claudio, Álvaro, Dannia, Palacios, Cony, Fanny, Gaby, Francisco, Vero).

A mis amigos de la universidad Andrea, Pablo, Pepa, Negra y Romi por su apoyo y amistad incondicional.

A Conicyt y a la PUCV por haber financiado mis estudios de post-grado.

RESUMEN

Piscirickettsia salmonis es una bacteria Gram negativa, agente etiológico de la Septicemia Rickettsial Salmonídea (SRS) o Piscirickettsiosis, enfermedad que desde hace más de dos décadas amenaza seriamente la sustentabilidad de la salmonicultura en Chile. No obstante, el gran impacto económico que produce esta enfermedad en la industria salmonera, aspectos básicos de la biología del patógeno son aún desconocidos. En los últimos años la clasificación taxonómica y caracterización del patógeno han cambiado rotundamente, al principio fue caracterizada como un organismo perteneciente al grupo Alfa-proteobacteria, filogenéticamente cercano a organismos del género *Rickettsia*, pero en la actualidad ha sido reclasificada dentro del grupo Gamma-proteobacteria, filogenéticamente cercano a *Legionella pneumophila*, *Francisella tularensis* y *Coxiella burnetii*, entre otros. Adicionalmente, el patógeno fue considerado como un organismo intracelular obligado, ya que su crecimiento era posible sólo en líneas celulares de peces e insectos, pero hoy en día está catalogado como un organismo intracelular facultativo.

A pesar de que hoy en día es posible obtener cultivos puros de *P. salmonis*, la secuenciación completa de su genoma no ha sido reportada, por lo que genes implicados en aspectos tan relevantes como metabolismo celular y virulencia son absolutamente desconocidos. Esto ha conllevado a que no existan medidas de prevención y profilaxis eficaces para controlar los brotes de la enfermedad que amenazan seriamente la producción de salmónidos en nuestro país. En otros patógenos, el conocimiento de los mecanismos de virulencia ha conducido al diseño de nuevas herramientas profilácticas, como por ejemplo, el diseño de vacunas mejoradas o de fármacos eficaces para el control de la enfermedad.

De acuerdo a los antecedentes señalados y teniendo en cuenta que en muchos patógenos los mecanismos de virulencia y patogenicidad están dados por la secreción de moléculas efectoras a través de uno o más de los sistemas de secreción bacterianos, este trabajo de tesis propuso estudiar los mecanismos de patogenicidad y virulencia de *P. salmonis* con la finalidad de obtener información clave para el diseño de nuevas alternativas de control para erradicar la enfermedad. Los factores de virulencia secretados por las bacterias patógenas tienen como objetivo interferir o modular el comportamiento de la célula huésped, con la finalidad de generar una infección productiva, evadiendo al sistema inmune. Por este razón, el principal objetivo de esta tesis fue la búsqueda de genes en *P. salmonis* que tuvieran relación con alguno de los seis sistemas de secreción en bacterias Gram negativas, con el

propósito de determinar al menos uno de ellos como mecanismo de patogenicidad para producir la enfermedad.

Se utilizaron diferentes estrategias para la búsqueda de los genes que conforman los distintos sistemas de secreción en *P. salmonis*; i) diseño de cebadores degenerados basados en regiones conservadas de las principales proteínas de cada uno de estos sistemas y ii) secuenciación parcial del genoma de la bacteria. Se logró determinar que el patógeno contiene al menos los sistemas de secreción Tipo I (SSTI) y Tipo IV-B (SSTIV-B) o Dot/Icm (Deficient in Organelle Trafficking/Intracellular Multiplication).

Respecto al SSTI, se logró identificar los genes para tres proteínas relacionadas con el sistema, dos de las cuales son estructurales (*toIC* y *hlyD*) y una es un efector de secreción, la α -hemolisina, lo que podría explicar el efecto citotóxico y lítico que produce la infección con *P. salmonis*, tanto *in vitro* como *in vivo*. Adicionalmente, se determinó que los genes del SSTI están transcripcionalmente activos en diferentes condiciones de crecimiento del patógeno, lo que indicaría que el sistema está funcional.

En cuanto al sistema de secreción Dot/Icm, se encontraron cuatro genes correspondientes a proteínas estructurales (ATPasa DotB, DotA, IcmK e IcmE), las que comparten una alta similitud de secuencia con sus homólogas de otros organismos como *L. pneumophila* y *C. burnetii*, en donde este sistema es el responsable de la supervivencia intracelular y evasión del sistema inmune del huésped. Asimismo, se pudo determinar que los genes *dot/icm* son expresados durante la infección *in vitro* y durante el crecimiento en medio libre de células, lo que indicaría que su expresión es constitutiva, y que ciertos efectos ambientales, como una disminución del pH, aumenta sus niveles de expresión. La sobreexpresión de los genes del SSTIV en pHs ácidos ha sido descrita en otros patógenos, señalándose que la acidificación del fagosoma que contiene a la bacteria en los macrófagos infectados sería el evento que gatilla la inducción de estos genes que generan la respuesta de la bacteria ante las defensas del huésped. Por consiguiente, los resultados obtenidos en este estudio demuestran que se aplicaría también a *P. salmonis*.

Conjuntamente, la secuenciación parcial del genoma de *P. salmonis* entregó información adicional, relacionada a dos potenciales mecanismos de virulencia. El primero, corresponde al Pili Tipo IV, uno de los principales mecanismos de virulencia de *F. tularensis* que participa en la adhesión inicial del patógeno a las células blanco permitiendo la exportación de algunas moléculas que favorecen la infección, además en otros organismos como *Vibrio*

cholerae está involucrado en la formación de biofilm, mecanismo fundamental para la persistencia e infectividad de éste patógeno. El segundo mecanismo de virulencia se encuentra relacionado con la biosíntesis flagelar. Se logró identificar casi por completo todos los genes que lo conforman, a pesar de que *P. salmonis* ha sido clasificada como una bacteria inmóvil. Sin embargo, se determinó que algunos de los genes reguladores de la cascada de expresión del flagelo se encuentran transcripcionalmente activos, pero su funcionalidad e implicancia en la virulencia deberán ser evaluadas a futuro.

Los resultados obtenidos en esta tesis revelan un nuevo conocimiento acerca de los factores de virulencia presentes en el genoma de *P. salmonis*, indicando que esta bacteria está bien equipada con un set de genes que promueven su sobrevivencia bajo las condiciones adversas que produce el sistema de defensa del huésped. Finalmente, el conocimiento de los genes implicados en la virulencia y patogenicidad de la bacteria tiene el potencial de ser usados como blanco para el diseño de nuevos fármacos o vacunas para controlar eficientemente esta enfermedad.

ABSTRACT

Piscirickettsia salmonis is a Gram-negative bacterium, etiological agent of the Salmonid Rickettsial Septicemia or Piscirickettsiosis, a disease that for more than two decades has seriously threatened the sustainability of the Chilean salmon aquaculture. Despite the significant economic impact that this disease produces in the salmon industry, basic aspects of its biology are still completely unknown. During the last years, *P. salmonis* taxonomic classification as well as its characterization have completely changed, at the beginning was characterized as an organism belonging to the Alpha-proteobacteria group, phylogenetically close to the Rickettsia genus. However, nowadays it has been reclassified within the Gamma-proteobacteria group, phylogenetically close to *Legionella pneumophila*, *Francisella tularensis* and *Coxiella burnetii*, among others. Additionally, the pathogen was considered as an obligate intracellular organism, due to the fact that it grew only in fish and insect cell lines. Today, it is categorized as a facultative intracellular organism.

Although, the bacteria can be grown in cell-free media to obtain pure cultures, the full genome sequencing has not been accomplished. Important genes involved in cellular metabolism and/or virulence aspects are still absolutely unknown and so, no preventive measures and effective prophylaxis to control the disease outbreak exist. In other pathogens, the knowledge of virulence mechanisms has led to design new prophylactic tools, like improved vaccines or effective drugs for control the disease.

With the information mentioned above and considering that the virulence and pathogenicity of many bacterial pathogens are given by the secretion of effector molecules throughout one or more secretion systems, the aim of the present thesis was focused on the *P. salmonis* pathogenicity and virulence in order to obtain relevant information for designing new prophylactic tools to control and eradicate the disease. The virulence factors secreted by pathogenic bacteria are intended to interfere or modulate the behavior of the host cell for generating a productive infection, so far evading the immune system. Consequently, the main aim of this work was to search genes related with one or more of the secretion systems already known in Gram-negative bacteria, in order to determine at least one of the pathogenicity mechanisms used by *P. salmonis* to produce disease.

Different strategies were used for searching the secretion genes of *P. salmonis*; i) design of degenerate primers of the major proteins of each one of the secretion systems and ii) partial sequencing of the bacterium genome. It was determined that the pathogen comprises at least

secretion systems Type I (SSTI) and Type IV-B (SSTIV-B) or Dot / Icm (Deficient in Organelle Trafficking / Intracellular Multiplication).

Regarding the TISS, it was possible to detect three genes, two structural (*tolC* and *hlyD*) and one secreted protein, α -hemolysin that may explain the lytic and cytotoxic effect caused by the *P. salmonis* infection both *in vitro* and *in vivo*. Additionally, it was determined that the TISS genes are transcriptionally active under different growth conditions of the pathogen, which indicates that the system is functional.

Furthermore, concerning to the Dot/Icm secretion system it was possible to identify four genes corresponding to structural proteins (*dotB* ATPase, *dotA*, *icmE* and *lcmK*), which share high sequence similarity with their counterparts *L. pneumophila* and *C. burnetii*, where this system is responsible for the intracellular survival and evasion of the host immune system. It was also determined that the *dot/icm* genes are expressed during the *in vitro* infection as well as in the cell-free medium growth, suggesting that its expression is constitutive, although some environmental effects such as the pH reducing, increases the expression levels of these genes. Overexpression of the SSTIV genes in acidic pHs has been described in other pathogens, indicating that the phagosome acidification in the infected macrophages should be the trigger event to produce the induction of these genes, causing a response of the bacterium against the host defenses, which according the results obtained in this thesis could also apply for *P. salmonis*.

In addition, the partial genome sequencing of *P. salmonis* has contributed with extra information, two putative new virulence mechanisms. The first one corresponds to the Type IV Pili, which is one of the major virulence mechanisms of *F. tularensis* involved in the initial adhesion of pathogens to the target cells, allowing the export of certain molecules that promote infection. The Type IV Pili is important as well in biofilm formation; for example, in *Vibrio cholera* is well documented as a crucial mechanism for persistence and infectivity of this pathogen. The second mechanism is related to the flagellar system. We achieved the identification of almost all the genes involved in the flagellum biosynthesis, although *P. salmonis* has been classified as a non-motile bacterium. Nevertheless, some of the genes implicated on the regulation cascade of the flagellum expression are transcriptionally active but its functionality and implication in virulence should be evaluated in the near future.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1. EL AGENTE: <i>Piscirickettsia salmonis</i> (<i>P. salmonis</i>).....	13
2.1.1 Patología.	14
2.1.2 Modo de Transmisión:	15
2.1.3 Métodos de detección de P. salmonis.	15
2.1.4 Prevención y profilaxis.	16
2.2 PRINCIPALES SISTEMAS DE PATOGENICIDAD BACTERIANA.....	17
2.2.1 Sistemas Generales de Secreción.	20
2.2.2 Sistema de Secreción Tipo I (SSTI).	21
2.2.3 Sistema de secreción Tipo II (SSTII)	21
2.2.4 Sistema de secreción Tipo III (SSTIII).	22
2.2.5 Sistema de Secreción Tipo IV (SSTIV).	26
2.2.6 Autotransportadores (Sistema de Secreción Tipo V –SSTV-).	32
2.2.7 Sistema de secreción tipo VI (SSTVI).	32
2.2.8 Sistema de Secreción Tipo VII (SSTII).	33
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	34
4. HIPÓTESIS.....	39
5. OBJETIVOS.	39
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	39
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
6. METODOLOGÍA	40
6.1 CULTIVO DE PISCIRICKETTSIA SALMONIS.....	40
6.1.1 Cultivo en placas.	40

6.2.2 Cultivo en medio líquido.	40
6.2 EXTRACCIÓN DE ADN DE <i>PISCIRICKETTSIA SALMONIS</i>	43
6.2.1 Chelex-100.	44
6.2.2 Extracción fenólica.	44
6.2.3 Extracción de ADN con Kit E.Z.N.A. Bacterial DNA Kit (Omega Biotek).	45
6.3 EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE LOS GENES DE LOS SSTI, II, III, IV, V Y VI EN EL GENOMA DE <i>PISCIRICKETTSIA SALMONIS</i>	45
6.3.1 Diseño de cebadores degenerados	46
6.3.2. Amplificación de los genes blanco con cebadores degenerados	47
6.3.3 Clonamiento y secuenciación de las secuencias amplificadas	47
6.3.4 Análisis de secuencias	49
6.3.5 “Long Range PCR” (LR-PCR)	50
6.3.6 Búsqueda de genes de secreción en el plásmido de <i>P. salmonis</i>	51
6.3.7 Secuenciación parcial del genoma de <i>P. salmonis</i>	53
6.4 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE SECRECIÓN/VIRULENCIA EN <i>PISCIRICKETTSIA SALMONIS</i>	54
6.4.1 EXPRESIÓN GENES SSTIV DOT/ICM	54
6.4.2 EXPRESIÓN DE GENES DE LOS SSTI Y GENES FLAGELARES	59
6.5 GENERACIÓN DE ORGANISMOS <i>KNOCK OUT</i> PARA EVALUAR IMPORTANCIA DE GENES DEL SSTIV EN LA PATOGENICIDAD	62
6.5.1 BÚSQUEDA DE SECUENCIAS PROMOTORAS EN EL GENOMA DE <i>P. SALMONIS</i>	62
6.5.2 CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN	66
6.5.3 TRANSFORMACIÓN DE <i>P. SALMONIS</i>	70
6.5.4 <i>KNOCK OUT</i> UTILIZANDO EL SISTEMA TARGETRON®	74
7. RESULTADOS	78
7.1 CRECIMIENTO DE <i>P. SALMONIS</i> EN CULTIVOS LÍQUIDOS	78
7.2 GENES DE SECRECIÓN/VIRULENCIA EN EL GENOMA DE <i>P. SALMONIS</i>	79
7.2.1 Genes del Sistema de Secreción Tipo I (SSTI)	79
7.2.2 Genes del Sistema de Secreción Tipo II (SSTII)/Pili Tipo IV	86
7.2.3 Genes del Sistema de Secreción Tipo III (SSTIII)/Genes Flagelares	91

7.2.4 Genes del Sistema de Secreción Tipo IV (SSTIV)	98
7.2.5 Genes de los sistemas de secreción Tipo V y VI (SSTV, SSTVI).....	106
7.3 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE SECRECIÓN/VIRULENCIA EN <i>P. SALMONIS</i>	106
7.3.1 EXPRESIÓN DE LOS GENES DEL SSTI.....	107
7.3.2 EXPRESIÓN DEL LOS GENES <i>DOT/ICM</i> (SSTIV)	108
7.3.3 EXPRESIÓN GENES FLAGELARES	114
7.4 GENERACIÓN DE ORGANISMOS <i>KNOCK OUT</i> PARA EVALUAR IMPORTANCIA DE GENES DEL SSTIV EN LA PATOGENICIDAD.....	115
7.4.1 BÚSQUEDA DE SECUENCIAS PROMOTORAS PROPIAS DE <i>P. SALMONIS</i>	115
7.4.2 TRANSFORMACIÓN DE <i>P. SALMONIS</i>	118
7.4.3 <i>KNOCK OUT</i> DEL GEN DE CHAP.S DE <i>P. SALMONIS</i> EN <i>E. COLI</i>	121
8. DISCUSION.....	124
8.1 SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO I.....	125
8.1.1 Presencia de genes del SSTI en el genoma de <i>P. salmonis</i>	125
8.1.2. Expresión de los genes del SSTI	126
8.2 Pili Tipo IV.....	127
8.2.1. Presencia genes Pili Tipo IV en el genoma de <i>P. salmonis</i>	127
8.3 SSTIV (<i>DOT/ICM</i>).....	128
8.3.1. Presencia genes <i>dot/icm</i> en el genoma de <i>P. salmonis</i>	128
8.3.2. Expresión de los genes <i>dot/icm</i> durante infección <i>in vitro</i>	131
8.3.3. Efecto del pH ácido en la expresión de los genes <i>dot/icm</i> en <i>P. salmonis</i>	132
8.4 GENES FLAGELARES/SSTIII EN EL GENOMA DE <i>P. SALMONIS</i>	134
8.4.1. Presencia de genes flagelares en el genoma de <i>P. salmonis</i>	134
8.5 GENERACIÓN DE ORGANISMOS <i>KNOCK OUT</i>	136
9. CONCLUSIONES.....	139
10. RECOMENDACIONES	142

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: “ <i>Piscirickettsia salmonis</i> en vacuolas citoplasmáticas en células infectadas.....”	14
Figura 2: “Esquema de la estructura de los siete sistemas de secreción bacterianos.....”	20
Figura 3: “Esquema representativo de la versatilidad del SSTIV.....”	26
Figura 4: “Modelo de la maquinaria de secreción del SSTIV (VirB/D4).....”	29
Figura 5: “Esquema técnica del RAGE”.....”	63
Figura 6: “Curva de crecimiento de <i>P. salmonis</i> en los medios DMEM-F12 y BB.....”	78
Figura 7: “Curva de crecimiento de <i>P. salmonis</i> en Medio Marino (MM) y MC1.....”	78
Figura 8: “PCR en gradiente del gen <i>hlyD</i> del SSTI con cebadores degenerados.....”	79
Figura 9: “alineamiento por BLASTX del de secuencias para determinar dominios conservados entre la proteína putativa HlyD de <i>P. salmonis</i> ”.....”	80
Figura 10: “Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de HlyD de <i>P. salmonis</i> predicha por BLASTX con las secuencias de organismos con mayor similitud”.....”	81
Figura 11: “PCR en gradiente del gen <i>hlyB</i> del SSTI con cebadores degenerados.....”	82
Figura 12: “Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de TolC de <i>P. salmonis</i> predicha por RAST y FgenesB”.....”	83
Figura 13: “Alineamiento múltiple de secuencias entre la proteína α -hemolisina de <i>P. salmonis</i> predicha por RAST y FgenesB”.....”	85
Figura 14: “Esquema general de la estructura del SSTI”.....”	85
Figura 15: “Gradiente de PCR para la amplificación del gen <i>puIE</i> del SSTII con cebadores degenerados”.....”	86
Figura 16: “Alineamiento múltiple de secuencias entre la secuencia de proteína putativa PilB de <i>P. salmonis</i> predicha por BLASTX”.....”	87
Figura 17: “Alineamiento múltiple de secuencias entre la secuencia de proteína putativa PilQ de <i>P. salmonis</i> predicha por RAST y FgenesB”.....”	89
Figura 18: “Alineamiento múltiple de secuencias entre la secuencia de proteína putativa FimT de <i>P. salmonis</i> predicha por RAST y FgenesB”.....”	90

Figura 19: “Esquema general de la estructura del Pili Tipo IV”	91
Figura 20: “Gradiente de PCR para la amplificación del gen <i>lcrD</i> (ATPasa) del SSTIII con cebadores degenerados”	91
Figura 21: “Alineamiento múltiple de secuencias entre la secuencia <i>FlhA</i> de <i>P. salmonis</i> , amplificada con los cebadores para <i>lcrD</i> , y las secuencias de mayor similitud”	92
Figura 22: “Esquema de la organización del contig00127 que contiene a los genes <i>flhA</i> (2030 pb) y <i>flhF</i> (1100 pb) del sistema flagelar”	93
Figura 23: “Esquema de la organización del contig00060 que contiene a los genes <i>fliJ</i> , <i>fliI</i> , <i>fliH</i> , <i>fliG</i> y <i>fliF</i> ”	94
Figura 24: “Esquema de la organización del contig00009 que contiene a los genes <i>flgB-K</i> , que codifican para proteínas estructurales del sistema flagelar”	95
Figura 25: “Esquema de la organización del contig00381, que contiene a los genes reguladores de la expresión de la maquinaria flagelar <i>fleN</i> y <i>fliA</i> ”	95
Figura 26: “Esquema de la organización del contig00095 que presenta los genes de las proteínas motoras de rotación flagelar <i>MotA</i> y <i>MotB</i> ”	96
Figura 27: “Purificación del plásmido de <i>P. salmonis</i> ”	96
Figura 28: “Gradiente discontinua de CsCl/Bromuro de Etidio visualizada bajo luz UV”	97
Figura 29: “Amplificación de los genes del <i>virB11</i> , <i>virD4</i> y <i>virB2</i> del SSTIV-A”	98
Figura 30: “Amplificación de los genes <i>icmK</i> y <i>dotB</i> del SSTIV-B con cebadores degenerados”	99
Figura 31: “Amplificación inespecífica de los genes <i>icmS</i> e <i>icmF</i> del SSTIV-B”	99
Figura 32: “Alineamiento múltiple de secuencias entre proteína putativa <i>DotB</i> de <i>P. salmonis</i> y las proteínas con mayor porcentaje de similitud”	100
Figura 33: “Alineamiento múltiple de secuencias entre la proteína putativa <i>IcmK</i> de <i>P. salmonis</i> y las proteínas con mayor porcentaje de similitud”	101
Figura 34: “Long Range PCR con cebadores <i>dotB</i> /ITS”	102
Figura 35: “Alineamiento múltiple de secuencias entre la proteína putativa <i>IcmE</i> de <i>P. salmonis</i> y las proteínas con mayor porcentaje de similitud”	103

Figura 36: Alineamiento múltiple de secuencias entre la proteína putativa DotA de <i>P. salmonis</i> y las proteínas con mayor porcentaje de similitud”.....	104
Figura 37: “Alineamiento múltiple de secuencias de las proteínas DotB, IcmK e IcmE de <i>P. salmonis</i> , obtenidas de la secuenciación del genoma, con proteínas con mayor porcentaje de similitud”.....	105
Figura 38: “RT-PCR para el gen de la porina TolC del SSTI”.....	107
Figura 39: “RT-PCR para los genes de las proteínas HlyD y HlyA del SSTI”.....	108
Figura 40: “Cuantificación de la expresión (transcripción) de los genes del SSTIV durante una cinética de infección <i>in vitro</i> ”.....	109
Figura 41: “Niveles de transcripción del ITS (operón ribosomal) durante una cinética de infección”.....	110
Figura 42: “QRT-PCR de la expresión del gen <i>dotB</i> de <i>P. salmonis</i> durante el crecimiento de la bacteria a diferentes pH”.....	111
Figura 43: “QRT-PCR de la expresión del gen <i>icmK</i> de <i>P. salmonis</i> durante el crecimiento de la bacteria a diferentes pH”.....	111
Figura 44: “QRT-PCR de la expresión del gen <i>icmE</i> de <i>P. salmonis</i> durante la cinética de crecimiento a diferentes pHs”.....	112
Figura 45: “QRT-PCR de la expresión del gen <i>dotA</i> de <i>P. salmonis</i> durante la cinética de crecimiento a diferentes pHs”.....	112
Figura 46: “QRT-PCR de la transcripción de la región ITS del operón ribosomal de <i>P. salmonis</i> durante la cinética de crecimiento a diferentes pHs”.....	113
Figura 47: “RT-PCR de genes reguladores de la de la cascada de expresión flagelar”.....	114
Figura 48: “RAGE2-PCR del 16S y ChaP.s”.....	116
Figura 49: Alineamiento de la secuencia nucleotídica de GroES de <i>P. salmonis</i> con GroES de <i>F. tularensis</i> ”.....	116
Figura 50: “Esquema de la organización de operón <i>groES-ChaP.s</i> ”.....	117
Figura 51: “Representación esquemática de la organización del operón TA <i>vapBC</i> de <i>P. salmonis</i> ”.....	118

Figura 52: “PCR con 4 cebadores para la modificación del intrón”.....121

Figura 53: “Validación por PCR de la inserción del intrón en en el nucleótido 1021 de ChaP.s”.....123

Figura 54: Comparación entre Pili Tipo IV de *E. coli* y sistema PAC de *P. salmonis*”.....127

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: “Principales SSTIII descritos hasta la fecha y su función más relevante”...25	25
Tabla 2: “Resumen de las funciones del SSTIV en patógenos de alto impacto”.....31	31
Tabla 3: “Composición de medios de cultivo MC1 y formulaciones de Pharmaq evaluados para el crecimiento de <i>P. salmonis</i> ”.....43	43
Tabla 4: “Genes blanco utilizados para el diseño de cebadores degenerados para los diferentes sistemas de secreción”.....46	46
Tabla 5: “Cebadores utilizados para QRT-PCR de los genes <i>dot/icm</i> ”.....56	56
Tabla 6: “Cebadores utilizados para RT-PCR genes flagelares y ChaP.s”.....61	61
Tabla 7: “Cebadores utilizados para el RAGE de ChaP.s y 16S”.....64	64
Tabla 8: “Cebadores utilizados para la construcción del cassette de expresión”.....67	67
Tabla 9: “Cebadores utilizados para la modificación del intrón en la secuencia de ChaP.s”.....75	75
Tabla 10: “Mayores homologías del gen <i>hlyD</i> de <i>P. salmonis</i> encontradas por BLASTX”.....81	81
Tabla 11: “Mayores homologías de la proteína putativa TolC de <i>P. salmonis</i> obtenidas por el análisis con BLASTP”.....83	83
Tabla 12: “Mayores homologías de la proteína α -hemolisina de <i>P. salmonis</i> encontradas por el análisis con BLASTP”.....84	84
Tabla 13: Homologías encontradas por el análisis con BLASTX a la secuencia amplificada con cebadores degenerados dirigidos al gen <i>pulE</i> (SSTII)”.....87	87
Tabla 14: “Mayores homologías encontradas por el análisis con BLASTX y BLASTP a la secuencia <i>pilQ</i> (Pili Tipo IV)”.....88	88
Tabla 15: “Mayores homologías encontradas por el análisis con BLASTP a la proteína putativa FimT (Pili Tipo IV)”.....89	89

Tabla 16: “Mayores homologías encontradas por BLASTN al producto obtenido de la amplificación con cebadores dirigidos a amplificar el gen <i>lcrD</i> del SSTIII”	92
Tabla 17: “Mayores homologías encontradas por BLASTX para el gen <i>dotB</i> del SSTIV-B”	100
Tabla 18: “Mayores homologías encontradas por BLASTX al producto obtenido de la amplificación con cebadores dirigidos al gen <i>icmK</i> del SSTIV-B”	101
Tabla 19: “Mayores homologías encontradas por BLASTX al fragmento <i>Sau3AI</i> derivado del LR-PCR (<i>dotB</i> /ITS)”	102
Tabla 20: “Mayores homologías encontradas por BLASTX al gen putativo <i>dotA</i> predicho por RAST”	103

1. INTRODUCCIÓN.

Sin lugar a dudas Chile es el primer país acuicultor en Latinoamérica. El principal auge de esta actividad está encabezado por la industria salmonera y cabe destacar que la forma como se desarrolló la salmicultura en nuestro país no tiene precedente en el mundo, por su rápido crecimiento y notable dinamismo (Informe Gemines, 2001). Actualmente, Chile es el segundo productor mundial de salmón y el primero en trucha, aportando el 5 % a las exportaciones totales del país. A su vez esta industria representa el 56% de las exportaciones pesqueras. Además, en la última década la industria se expandió a una tasa promedio del 22%. (SalmónChile, 2007). Los principales importadores del salmón producido en Chile son Estados Unidos y Japón, que en conjunto abarcan el 64% del volumen. Esta industria da empleo aproximadamente a 40 mil personas, principalmente de la décima y undécima región del país (Bustos, 2008).

Este rápido e impresionante crecimiento de la industria de debe específicamente a que existen pocos lugares en el planeta que reúnan las condiciones ambientales del llamado "cinturón del salmón", que comprende 1700 kilómetros de longitud de islas, fiordos y bahías ideales para el cultivo del pez: desde Puerto Montt hasta Punta Arenas. Las condiciones del agua son excelentes, puras, limpias, sin contaminación y con temperaturas que fluctúan entre los 7 y 16 grados Celsius durante todo el año. Otro factor que favorece son las abundantes precipitaciones, de 4000 milímetros de lluvia como promedio anual (SalmónChile, 2006). El mundo salmonero que se desarrolla en el sur de Chile concentraba el fuerte de la actividad en la X Región, la que se extendió paulatinamente hacia las regiones de Aysén y Magallanes, y se han proyectado como las zonas de mayor crecimiento salmonero en el siglo XXI. Son cuatro las principales especies de salmónidos cultivadas en Chile, Salmón Atlántico (*Salmo salar*), Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*), Salmón Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) y Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (SalmónChile, 2007).

Las exportaciones de salmón y trucha generaron una ganancia de US\$ 2.241.710 millones durante 2007, monto superior en un 2% respecto a 2006, según cifras de la Asociación de la Industria del Salmón de Chile A.G., SalmonChile. En 2007 se exportaron un total de 397.039 toneladas netas de salmón y trucha, lo que implicó un aumento en los envíos de un 3% en volumen con respecto a igual periodo del año anterior (Intesal, 2007). Durante el 2008 las

exportaciones crecieron a US\$ 2.392.000, subiendo un 7% respecto al año anterior (SalmónChile 2008). En cambio, durante el año 2009 las exportaciones de salmónidos cayeron un 13% respecto al año 2008, llegando a un total de US\$ 2.068.000, debido a que las cosechas se anticiparon a causa del problema sanitario ocurrido en la industria, el que fue generado por la aparición del virus de la Anemia Infecciosa del Salmón (ISAv) (SalmónChile 2010). En el año 2011 hubo un repunte de la actividad salmonera con respecto al año 2010. La producción de salmón atlántico y salmón del pacífico fue de 51% y 38% superior, respectivamente y sólo la producción de trucha fue menor al año anterior, lo que generó que las exportaciones de salmónidos registraran un incremento del 61% en relación con el 2010, transformando a la industria en una de las que mayor crecimiento tuvo durante el 2011 (Sernapesca, 2011). Cabe mencionar que durante el año 2011 la industria acuícola generó ganancias US\$ 4.228 millones, cifra inédita en la historia de las exportaciones sectoriales, y dentro de ese total los salmónidos representaron la mitad de las ganancias (SalmónChile2011). Todos estos antecedentes demuestran la importancia de la industria salmonera en la economía nacional.

A pesar de este abrupto crecimiento y de la alta rentabilidad económica que ha mostrado esta industria en los últimos 20 años, aun existen ciertos problemas asociados a su producción y que amenazan de forma constante su sustentabilidad. De ellos el de mayor impacto corresponde a la aparición de organismos patógenos con brotes recurrentes que merman gravemente la producción. Ejemplo claro de este aspecto ocurrió durante el año 2007 con la aparición del virus ISA que provocó una disminución significativa en la producción. Entre los patógenos de mayor relevancia se encuentran: el Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa-IPNV (Smail *et al.*, 2006; Rodriguez *et al.* 2003), el Virus de la Anemia del Salmón (Cottet *et al.*, 2011; Kibenge *et al.*, 2006), el hongo *Saprolegnia parasitica* (Zaror *et al.*, 2004) y varias bacterias, principalmente Gram-negativas, a excepción de *Renibacterium salmoninarum* que es un patógeno Gram-positivo (Sanders and Barros, 1986). Entre las Gram-negativas más frecuentes encontramos, *Aeromonas salmonicida* (Balcázar *et al.* 2007), *Vibrio ordalii* (Bohle *et al.*, 2007), *Flavobacterium columnare* (Bader *et al.*, 2003) y últimamente, la aparición de la bacteria *Francisella piscicida* o *Francisella philomiragia* subespecie *noatunensis*, la que fue anteriormente conocida como UA2 o *Francisella piscicida* (Birkbeck *et al.*, 2007; Bohle *et al.*, 2009). Sin embargo y sin lugar a dudas el patógeno de mayor relevancia y persistencia en la industria ha sido y continúa siendo la bacteria *Piscirickettsia salmonis*, que desde su aparición en

1989 (Bravo y Campos, 1989) ha mostrado una alta agresividad, persistencia y ha sido refractaria a los tratamientos profilácticos aplicados para su control (Marshall *et al.*, 2007; Tobar *et al.*, 2011), además de generar pérdidas anuales que superan los US\$ 100 millones anuales por efecto de constantes brotes (SalmonChile, 2007; Bravo y Midtlyng, 2007).

Piscirickettsia salmonis fue antes descrita como la primera bacteria intracelular Gram negativa aislada desde peces (Bravo y Campos, 1989; Fryer y Hedrick, 2003), pero en la actualidad ha sido reclasificada como un organismo intracelular facultativo por su capacidad de crecer en medios bacteriológicos libres de células (Mikalsen *et al.*, 2008; Mauel *et al.*, 2008; Gómez *et al.*, 2009; Yañez *et al.*, 2012). También se han registrado brotes de la enfermedad en Escocia, Irlanda, Noruega y en la Costa del Pacífico de Canadá (Kuzyk *et al.*, 1996), donde las pérdidas económicas también han sido considerables, pero nunca en el nivel en que se ha visto afectada la producción en Chile (Almendras *et al.*, 1997). Por otra parte, no solamente salmónidos se han visto afectados por *P. salmonis*, ya que se ha detectado la presencia de este patógeno en especímenes de Corvina Blanca (*Atractoscion nobilis*) en la costa del sur de California, siendo la bacteria propagada tanto *in vivo* como *in vitro* (Arkush *et al.*, 2005). En Grecia, especímenes de Lubina (*Dicentrarchus labrax*) también se han visto afectados por un patógeno muy similar a *P. salmonis* (Athanassopoulou *et al.*, 2004). En Hawai poblaciones de Tilapia (*Oreochromis mossambicus* y *Sarotherodon melanotheron*), tanto de vida libre como de cultivo, han sufrido una enfermedad tipo-Piscirickettsiosis (Mauel *et al.*, 2003); lo que sugiere que la expansión de este agente a otras especies de peces de importancia comercial ya se ha iniciado (Marshall *et al.*, 2007).

La biología de *P. salmonis* ha sido muy poco estudiada, principalmente debido a que hasta el año 2008 no existía un medio bacteriológico para su crecimiento. El hecho de que solamente se haya logrado el crecimiento de este patógeno en líneas celulares imposibilitaba en cierto modo la caracterización genética de la bacteria, específicamente por la contaminante adicional provocada por las células de cultivo. A la fecha, la secuenciación del genoma de *P. salmonis* no ha sido completada o al menos ha sido anotada en alguna base de datos, por lo cual la investigación tanto en aspectos metabólicos, ciclo de vida y virulencia del patógeno siguen siendo desconocidos. En base a estos antecedentes, es de suma importancia el conocimiento de los genes que participan en la patogenicidad y virulencia de *P. salmonis*, con la finalidad de obtener una mayor comprensión de cuales son

los mecanismos que utiliza este patógeno para infectar, invadir y diseminarse en el huésped. Adicionalmente, con la obtención de esta información se podrían hallar alternativas de prevención y profilaxis más eficaces para tratar y prevenir nuevos brotes de la enfermedad, así como ha ocurrido con otras enfermedades bacterianas.

Expuestos estos antecedentes, se plantea determinar cual (es) sería el mecanismo (s) de virulencia y patogenicidad de *P. salmonis*. Para ello se buscarán genes relacionados con aparatos de secreción de los Sistemas de Secreción Tipo III (SSTIII) y Tipo IV (SSTIV), ambos de gran importancia en los procesos de infección en bacterias Gram-negativas. El SSTIII es el más conservado evolutivamente en bacterias Gram-negativas patógenas y el SSTIV es el responsable de los mecanismos de supervivencia intracelular y evasión del sistema inmune de varios patógenos de importancia. Además, se propone evaluar los niveles de expresión de los genes de virulencia en diferentes condiciones de crecimiento de la bacteria.

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1. EL AGENTE: *Piscirickettsia salmonis* (*P. salmonis*).

Piscirickettsia salmonis es una bacteria Gram-negativa y agente etiológico de la Septicemia Rickettsial Salmonídea (SRS) o Piscirickettsiosis, la cual fue detectada por primera vez en 1989, en especímenes de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) afectados por altas mortalidades en el sur de Chile (Bravo y Campos, 1989). Este patógeno es una bacteria inmóvil, no capsulada, pleomórfica, pero que generalmente se presenta cocoide, y de tamaño variable entre 0.5 y 1.5 μm de diámetro (Fryer *et al.*, 1990; Kuzyk *et al.*, 1996). Taxonómicamente *P. salmonis* se ubica dentro del grupo Gamma-Proteobacteria y es una de las tres especies pertenecientes a la familia Piscirickettsiaceae, separada de la familia Rickettsiaceae como había sido descrita anteriormente (Mauel *et al.* 1999). La bacteria se replica por bipartición en la célula huésped, dentro de vacuolas citoplasmáticas, de las cuales se libera destruyendo al huésped (Fryer *et al.*, 1990). En brotes naturales de la enfermedad la bacteria ha sido reportada en hígado, riñón y cerebro, así como también en macrófagos asociados al riñón, bazo y sangre periférica (macrófagos de la respuesta

inflamatoria) (Branson y Diaz-Muñoz, 1991; Almendras *et al.*, 1997). *In vitro* la bacteria produce efecto citopático en diferentes líneas celulares de salmónidos y en algunas de peces de aguas cálidas causando inicialmente la formación de agrupaciones de células redondeadas y vacuolizadas y por último provocando la lisis celular con desprendimiento de la monocapa (Figura 1) (Fryer *et al.*, 1990). Adicionalmente, ha sido descrito que la bacteria es capaz de infectar cultivos primarios y líneas celulares del sistema inmune de peces, específicamente monocitos y macrófagos, lo que podría indicar que estas células son el primer blanco de la bacteria al entrar a un pez susceptible (McCarthy *et al.*, 2008; Rojas *et al.*, 2009).

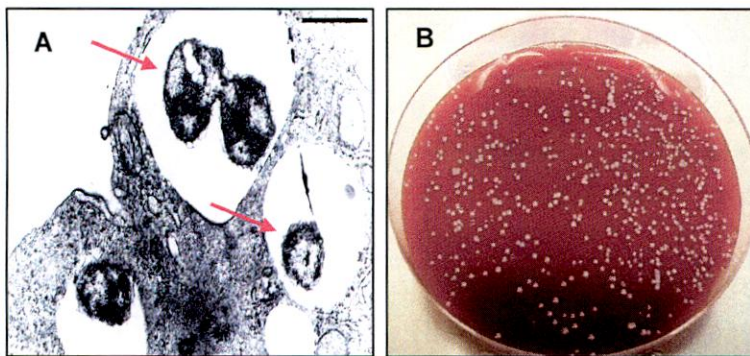


Figura 1: **A:** *P. salmonis* dentro de vacuolas citoplasmáticas en células CHSE-214 (*Oncorhynchus tshawytscha*) infectadas. Las flechas indican la bacteria en división. **B:** *P. salmonis* crecida en placas de agar sangre.

2.1.1 Patología.

La enfermedad se caracteriza por su amplio espectro clínico y morfológico el cual depende del curso de la enfermedad (aguda, crónica), especie, peso de los peces, manejo y estado inmunitario, entre otros factores. En general, los signos evidentes que muestra un pez enfermo de SRS son: natación errática, aletargamiento, anorexia, orillamiento, y oscurecimiento de la piel. Ocurre también palidez branquial, hemorragias en la base de las aletas, aparición de nodulaciones y ulceraciones en la piel debido a la pérdida de escamas (Lannan *et al.*, 1999). La bacteria causa una infección sistémica en tejidos, afectando a la mayoría de los órganos, como el hígado, riñones, corazón, cerebro, intestinos, ovarios, bazo y branquias (Bravo y Campos, 1989; Kuzyk *et al.*, 1996). En los últimos años se ha detectado una sintomatología atípica en trucha arcoiris, la que corresponde a una inflamación hemorrágica de la musculatura, asociada a lisis muscular, dando origen a cavernas musculares, las cuales pueden o no ser evidenciadas externamente. El contenido de estas cavernas es viscoso de color variable opaco a hemorrágico con un alto contenido bacteriano (Sergio Marshall, comunicación personal).

2.1.2 Modo de Transmisión:

Los estudios existentes han descrito la enfermedad principalmente en agua de mar y en estuarios (Fryer *et al.*, 1990; Cvitanich *et al.*, 1991), aunque también se ha reportado en agua dulce (Gaggero *et al.*, 1995). La teoría más aceptada del modo de diseminación del patógeno sería por las heces y orina de peces infectados, siendo el agente capaz de ingresar a otros individuos a través de las branquias y/o por la piel intacta (Larenas *et al.*, 1997). La presencia de ectoparásitos o lesiones en la piel de los peces, posiblemente, favorecerían la entrada del patógeno y el posterior contagio a otros individuos (Fryer y Mauel, 1997). Es posible que también exista un modo de transmisión vertical de la enfermedad por ovas o espermios, lo que se ha sido demostrado en salmones coho naturalmente infectados (Larenas *et al.*, 1996). Fryer y colaboradores (1990) demostraron que ciertos vectores marinos podrían estar involucrados en la mantención de la bacteria en el medio. Mediante inmunofluorescencia directa se ha detectado a *P. salmonis* en el parásito hematófago *Ceratothoa gaudichaudi* y en el ectoparásito *Caligus sp*; lo cual indica que éstos podrían ser vectores o reservorio del patógeno (Garcés *et al.*, 1991; Correal, 1995; Venegas, 1996). También se ha descrito que *P. salmonis* es capaz de sobrevivir en agua de mar por aproximadamente 14 días, lo que indicaría que la bacteria se puede mantener en el medio marino en una cierta densidad poblacional (Lannan y Fryer, 1994). Recientemente, se ha reportado que la bacteria es capaz de mantenerse en cierta densidad poblacional en el agua de mar al menos 40 días, ya sea en la superficie como a 5 metros de profundidad, dato importante para determinar un periodo de barbecho cuando hayan brotes de la enfermedad (Olivares y Marshall, 2010).

2.1.3 Métodos de detección de *P. salmonis*.

La biología molecular es una herramienta que ha simplificado bastante la detección de este patógeno. La técnica de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) ha sido utilizada para la detección de la bacteria en muestras de tejidos o de cultivos celulares, mediante el uso de cebadores dirigidos a amplificar secuencias blanco en la región del 16S del operón ribosomal (Mauel *et al.*, 1996) y además, con cebadores dirigidos a amplificar la secuencia de la región espaciadora del operón ribosomal (ITS – Internal Transcribed Spacer), pudiendo detectar claramente la presencia de la bacteria en sueros extraídos desde peces enfermos (Marshall *et al.*, 1998). Adicionalmente, el gen de la proteína inmunogénica ChaP.s también ha sido utilizado con éxito como marcador molecular para la identificación de este patógeno, ya sea mediante PCR o por la utilización de anticuerpos específicos

contra la proteína (Gómez *et al.*, 2009). Con estas herramientas de alta especificidad no se hace estrictamente necesaria la secuenciación para determinar la identidad de la bacteria.

A diferencia de lo anterior, el típico diagnóstico de la enfermedad se basaba en la observación de signos evidentes presentados por los peces, ya sean externos como internos (mencionados anteriormente), lo que lleva al sacrificio del animal, combinado con una demostración de la presencia de *P. salmonis* realizando varios procedimientos que se mencionan a continuación:

- a) Aislamiento de la bacteria desde hígado, cerebro y riñón de peces enfermos o que presenten síntomas externos de la enfermedad para su crecimiento en cultivos celulares hasta observar la aparición de efectos citopáticos en las células (10 a 15 días), lo que hace que su detección se escape de técnicas rutinarias utilizadas para el aislamiento de bacterias (Fryer *et al.*, 1990; Fryer y Hendrick, 2003).
- b) Observación del patógeno, desde frotis de órganos de peces, por medio de tinciones poco específicas como Giemsa, Gram y naranja de acridina (Fryer *et al.*, 1990; Cvitanich *et al.*, 1990).
- c) Para realizar la confirmación de *P. salmonis* se han utilizado métodos serológicos, como es el caso anticuerpos fluorescentes (inmuno-histoquímica e inmuno-citoquímica) para determinar la presencia de la bacteria en órganos y en cultivos celulares sospechosos, además de la técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

2.1.4 Prevención y profilaxis.

Hasta la fecha los intentos para evitar los brotes de la piscirickettsiosis han sido de limitado alcance y por, no ha podido ser erradicada de las zonas afectadas. Una medida general adoptada por los centros de cultivo con el fin de reducir las pérdidas, ha sido disminuir las densidades poblacionales por jaula (Bravo y Campos, 1989). A pesar que la cepa tipo *P. salmonis* LF-89 (ATCC VR 1361) presenta una alta sensibilidad a antibióticos en condiciones controladas de laboratorio, los resultados de las terapias con antibióticos *in vivo*, específicamente vía oral han sido poco efectivos contra la enfermedad y en general no han sido capaces de controlar efectivamente a la bacteria. Esto podría deberse al posible hecho de la aparición de resistencia en algunas cepas, como ha ocurrido con muchas especies bacterianas (Smith *et al.*, 1996); variabilidad en los tiempos y dosis de aplicación de las drogas y el uso cada vez mayor de nuevas alternativas de tratamiento. Otra causal

del efecto mínimo de los antibióticos se debe a que la bacteria se replica dentro de las células del huésped, por tanto los niveles de antibióticos usados no alcanzarían la concentración suficiente para ingresar a las células (Fryer y Mael, 1997).

En la actualidad ninguna vacuna es completamente eficiente para controlar la enfermedad. La mayoría de las vacunas, existentes en el mercado, están basadas en bacterias inactivadas (bacterinas) con formalina o con algún otro agente químico, explicando que su poca eficiencia se debe al fuerte tratamiento de inactivación, el cual dañaría de algún modo a los antígenos de superficie. Las bacterinas no han sido las únicas candidatas para la elaboración de nuevas vacunas contra *P. salmonis*. También se han iniciado estudios para identificar y caracterizar nuevas proteínas antigénicas que puedan ser utilizadas como posibles inmunógenos. Es aquí donde surgen las mayores expectativas a la hora de la formulación de una vacuna que sea realmente eficaz en la prevención de *P. salmonis*. Entre los nuevos antígenos que han sido descritos se pueden mencionar a la lipoproteína OspA de 17 kDa (Kuzyk *et al.*, 2001), las Hsp 70, Hsp16 y Hsp10 (Wilhelm *et al.*, 2003; Wilhelm *et al.*, 2005), y la proteína inmunogénica ChaP.s (Chaperona HSP60 de *Piscirickettsia salmonis*), descrita por Marshall *et al.*, en 2007.

Debido al impacto económico que tiene *P. salmonis* en la industria salmonera nacional, se hace de suma urgencia un mayor entendimiento de su biología y de los mecanismos de patogenicidad que ella utiliza durante la infección, para de esta forma hallar un método de control eficiente y así, evitar las grandes pérdidas económicas que este patógeno continúa provocando en la salmonicultura chilena.

2.2 PRINCIPALES SISTEMAS DE PATOGENICIDAD BACTERIANA

En los últimos años la aplicación de las técnicas de ingeniería genética en el estudio de la patogenicidad bacteriana ha abierto un nuevo campo en el análisis de la virulencia a nivel molecular. El conocimiento completo de genomas de importantes patógenos bacterianos, junto al desarrollo de técnicas de biología celular que permitan estudiar las interacciones entre los microorganismos y las células hospederas han hecho posible hoy en día, poder hablar de la disciplina denominada microbiología molecular y celular. Sin duda, el conocimiento de los mecanismos moleculares de la virulencia bacteriana permitirá identificar

nuevas funciones relacionadas con la patogenicidad o con la transmisión de enfermedades infecciosas. Un punto importante a mencionar se refiere a la elucidación de moléculas y mecanismos utilizados por las bacterias patógenas en los procesos de invasión, en términos prácticos, permitirían mejorar el diagnóstico de ciertas enfermedades hasta llegar a la creación de nuevos antibióticos y vacunas mejoradas (Hueck, 1998).

Las bacterias corresponden a uno de los grupos de organismos vivos más diversos existentes en nuestro planeta, se encuentran adaptadas a una amplia variedad de ambientes ecológicos, incluyendo plantas, animales y el hombre. En general, las bacterias secretan un gran número de proteínas al medio externo, incluyendo toxinas, adhesinas, como también, diversas enzimas hidrolíticas que son requeridas en diferentes aspectos de su ciclo de vida, como por ejemplo, en la biogénesis de organelos, la adquisición de nutrientes y en la expresión de factores de virulencia (Flores Herrera *et al.*, 2003). Las bacterias patógenas presentan un asombroso arsenal de moléculas de superficie que participan en los procesos de invasión de las células del hospedero, y además son capaces de secretar toxinas utilizadas en la colonización de distintos nichos a través del proceso de infección (Pizarro-Cerda J. y Cossart P., 2006). Puesto que la colonización bacteriana a células del hospedero depende, en general, de proteínas extracelulares, los mecanismos de secreción se han convertido en el centro de estudio de las investigaciones microbiológicas. Adicionalmente, las bacterias forman una gran diversidad de asociaciones entre sí, que van desde la formación de biopelículas hasta el mutualismo, en las cuales la secreción de proteínas juega un rol central para modular estas interacciones, por lo que los sistemas de secreción son también muy importantes en la interacción entre bacterias y no solamente participan en la interacción patógeno-hospedero (Tseng *et al.*, 2009).

La mayor parte de las investigaciones en el campo de la microbiología molecular se han centrado en los sistemas de secreción de las bacterias Gram-negativas, donde las proteínas a translocarse o secretarse deben atravesar dos barreras lipídicas separadas por un espacio periplásmico y por una pared de peptidoglicano, que corresponden a la membrana interna y externa, respectivamente; esta última es una bicapa lipídica asimétrica cuya cara exterior está compuesta principalmente por lipopolisacáridos (Lee *et al.*, 2001). En bacterias Gram-positivas la secreción de proteínas hacia el medio externo requiere del transporte a través de una sola membrana, por lo que algunos géneros como *Bacillus* pueden ser utilizados industrialmente para la producción comercial de ciertas proteínas extracelulares, obtenidas

con rendimientos muy altos; sin embargo, este proceso ha sido poco estudiado en estos microorganismos. Recientemente, con la secuenciación de diversos genomas de bacterias Gram-positivas, se ha detectado que muchos genes que participan en el proceso de secreción de la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli*, también están presentes en estos organismos, como es el caso de los sistemas Sec-dependientes (Van Wely *et al.*, 2001).

Se define como secreción al transporte activo de proteínas que ocurre a través del sistema membranoso bacteriano, mientras que la translocación se refiere al transporte de proteínas a través de la membrana plasmática del hospedero (Büttner y Bonas, 2002). En bacterias se han descrito, al menos siete sistemas principales de secreción de proteínas hacia el medio extracelular. Las vías de secreción en las bacterias Gram-negativas han sido clasificadas en seis grupos principales: secreción tipo I, II, III, IV, V (autotransportadores) y VI. Para Gram-positivas y organismos del género *Mycobacterium* se ha descrito un nuevo sistema, el Sistema de Secreción Tipo VII. La clasificación de los sistemas de secreción se basa en la naturaleza molecular de las maquinarias de transporte y en las reacciones que éstas catalizan (Lee *et al.*, 2001). Sin embargo, estos grupos se pueden aún subdividir en dos grandes clases dependiendo del mecanismo que se utilice para el transporte a través de la membrana plasmática. Los sistemas de dos pasos, que utilizan las maquinaria de secreción del sistema Sec (Sistema General de Secreción) o del sistema Tat (Twin Arginine) para exportar las proteínas al periplasma (Koster *et al.*, 2000); y los sistemas de un solo paso en donde los sustratos se pueden secretar directamente desde el citosol hasta el exterior celular sin que exista un intermediario periplásmico, ni una secuencia señal en el amino terminal (Thanassi *et al.*, 2000). A continuación se describirá brevemente cada uno de los sistemas de secreción bacterianos. Cabe resaltar que los sistemas de secreción tipo III y IV son los mecanismos de patogenicidad más conservados en las bacterias Gram-negativas. En la figura 2, se puede observar la estructura que presentan cada uno de los sistemas que utilizan las bacterias para la exportación de moléculas al medio extracelular.

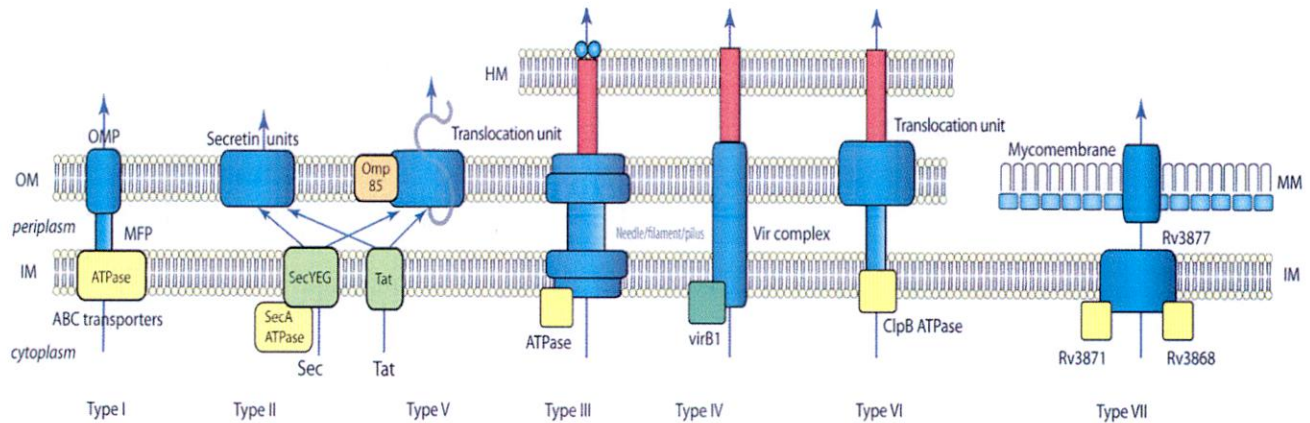


Figura 2: Esquema de la estructura de los siete sistemas de secreción bacterianos. La organización de los sistemas VI y VII ha sido dilucidada recientemente. En los sistemas I, III, IV, VI y VII la exportación de moléculas ocurre en una sola etapa. En los sistemas V y II la exportación ocurre en dos etapas, la primera hacia el espacio periplasmático y la segunda exporta las moléculas hacia el medio extracelular (Tseng *et al.*, 2009). MFP: Proteína de fusión de membrana o membrane fission protein.

2.2.1 Sistemas Generales de Secreción.

A) Sistema Sec:

El sistema Sec está constituido por el complejo de proteínas Sec Y-E-G y es el sistema de secreción de proteínas bacterianas más conservado (Pugsley, 1993). Es homólogo al sistema de translocación del retículo endoplasmático de eucariotas y al translocón Sec 61 de levaduras. Las proteínas secretadas por este sistema, son proteínas no plegadas que contienen un péptido señal en el amino-terminal, el cual es eliminado al realizarse la translocación hacia el espacio periplasmático, en donde ocurre el plegamiento (Lycklama *et al.*, 2012).

B) Sistema Tat:

Este sistema se caracteriza por exportar proteínas plegadas, las cuales contienen un péptido señal que contiene tres dominios: una región positiva en el N-terminal, un dominio hidrofóbico y un dominio C-terminal. La secuencia que dirige la translocación contiene un motivo consenso muy conservado formado por: Ser/Thr-**Arg-Arg**-X-Phe-Leu-Lys (Lee *et al.*, 2006).

2.2.2 Sistema de Secreción Tipo I (SSTI).

Este mecanismo es utilizado por una amplia gama de bacterias para la secreción de toxinas, proteasas y lipasas, correspondiendo a una vía de un solo paso (Thanassi *et al.*, 2000). El SSTI está constituido por tres componentes: un canal en la membrana externa formado por una proteína de membrana externa PME (también conocida como TolC), un transportador tipo ABC (ATP binding cassette) en la membrana interna y una proteína periplásmica que también está anclada a la membrana interna y que se denomina proteína de fusión, la que genera un canal en el periplasma (Buchanan, 2001). Los sistemas de transporte ABC pertenecen a una superfamilia de transportadores que son también utilizados por bacterias Gram-positivas y que existen también en eucariontes, desde levaduras hasta el hombre, siendo los responsables del transporte de un gran número de iones y moléculas pequeñas (Binet *et al.*, 1997). El transportador ABC del SSTI contiene dos dominios citoplasmáticos para la hidrólisis de ATP y dos dominios transmembrana (Delepelaire, 2004). El mejor ejemplo para la secreción de proteínas de virulencia por este sistema corresponde a la toxina α -hemolisina (HlyA) de una cepa de *E. coli* uropatogénica, clasificada como un importante factor de virulencia por su citotoxicidad (Goebel *et al.*, 2002). Otros factores de virulencia exportados por este sistema son las metaloproteasas, adhesinas y glicanasas secretadas por patógenos de plantas *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xylella fastidiosa* (Reddy *et al.*, 2007).

2.2.3 Sistema de secreción Tipo II (SSTII).

Muchos determinantes de virulencia son secretados por el SSTII, entre los que se destacan la toxina ADP-ribolisilasa de *E. coli* enterotoxigénica, la toxina del cólera (*Vibrio cholerae*), la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* y las pectinasa y pectato liasas de *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi*), *Erwinia amylovora* y *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Tseng *et al.*, 2009). La secreción por esta vía ocurre en dos etapas, primero la maquinaria Sec o el sistema Tat transloca el sustrato con péptido líder a través de la membrana plasmática (Driessen *et al.*, 2001). En una segunda etapa, la proteína pierde el péptido señal en el espacio periplásmico, para posteriormente ser secretada a través de la membrana externa por un complejo sistema multiprotéico llamado tipo II o “secretón” (Driessen *et al.*, 2001). El secretón incluye a dos proteínas de membrana externa: i) GspD,

proteína integral de membrana de la familia de las secretinas; ii) GspS, que corresponde a una pequeña lipoproteína necesaria para dirigir la inserción de GspD en la membrana externa (Thanassi y Hultgren, 2000). Adicionalmente, este sistema contiene varios componentes asociados a la membrana interna, GspC, F, K, L y M, y un componente citoplasmático GspE que tiene actividad ATPasa (Py *et al.*, 1999). Estos últimos componentes del SSTII parecen estar involucrados en la formación del poro en la membrana interna, en la formación de una estructura similar a un Pili que abarca todo el periplasma y provee la energía (GspE) requerida para regular la apertura del poro en la membrana externa (Cianciotto, 2005; Filloux, 2004).

2.2.4 Sistema de secreción Tipo III (SSTIII).

Una gran cantidad de bacterias Gram-negativas patógenas, tanto de plantas como de animales, han desarrollado un sistema especial para secretar proteínas hacia el citoplasma de las células de sus organismos huéspedes, denominado Sistema de Secreción Tipo III, que corresponde a un sistema de un solo paso (Galán *et al.*, 1999). Las proteínas secretadas, a través de este sistema, permiten modular o alterar las funciones celulares del organismo infectado mediante distintas funciones (proteólisis, hemólisis, citotoxicidad, fosforilaciones, etc.) con la finalidad de generar el beneficio del patógeno (Hueck *et al.*, 1998).

Los genes que codifican al SSTIII expresan más de 20 proteínas agrupadas en varias familias que se asocian a la envoltura de la bacteria, para formar una maquinaria macromolecular compuesta por anillos externos e internos, conectados por un complejo multi-proteico, una estructura que sale de la superficie de la bacteria y varias proteínas asociadas a la membrana interna incluida una ATPasa (Jennings *et al.*, 2012). La gran cantidad de proteínas que lo conforman han transformado al SSTIII en uno de los sistemas de secreción más complejos conocido en bacterias hasta el día de hoy (Kubori *et al.*, 2000). A pesar que las proteínas secretadas por esta vía son altamente específicas para cada especie bacteriana, las proteínas del aparato de secreción están altamente conservadas en los distintos patógenos que ha sido descrito (Troisfontaines y Cornelis, 2005). La secreción de las proteínas externas de *Yersinia* (Yops) por *Yersinia spp.* representa el prototipo típico del SSTIII. La translocación de las proteínas Yops al citosol de las células huésped interrumpe las vías de señalización celular, permitiendo que la bacteria evada los

mecanismos de defensa del huésped (Galan y Bliska, 1996). El aparato de secreción del SSTIII en *Yersinia* contiene una familia de 11 proteínas, denominadas Ysc (YscC, YscD, YscJ, YscL, YscN, YscQ, YscR, YscS, YscT, YscU y YscV), las que están altamente conservadas en los diferentes SSTIII. De las más de 20 proteínas que conforman el SSTIII, alrededor de 10 comparten a su vez similitud con el aparato de exportación flagelar (Plano *et al.*, 2001). Interesantemente se ha visto una similitud extraordinaria en la estructura molecular del SSTIII y el cuerpo basal del flagelo en *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexnerii* y *Escherichia coli* (Büttner y Bonas, 2002). Este hecho ha sugerido que el SSTIII y el sistema de exportación flagelar posean un ancestro común, aunque existen discrepancias en el tema.

El aparato de secreción del SSTIII consiste básicamente en tres partes: un bulbo citoplasmático, una región formada por dos pares de anillos que atraviesa el sistema membranoso de la bacteria y una estructura semejante a una aguja de 60 nm de longitud que sobresale por la superficie celular (Andreas *et al.*, 2007); de las cuales las dos últimas regiones conforman una estructura denominada “inyectosoma” o “complejo aguja” (Blocker *et al.*, 2001). La longitud del complejo aguja está regulado genéticamente por el gen *fliK* (Journet *et al.*, 2003), habiéndose demostrado que mutaciones en este gen producen una longitud indefinida de la aguja, aunque no está claro como *fliK* participa en esta regulación (Hirano *et al.*, 1994). Además, se ha visto que la longitud también se encuentra ajustada en relación a otras macromoléculas de la superficie bacteriana (Mota *et al.*, 2005). La aguja se pone en contacto directo con la célula hospedera y de esta forma regula la secreción, aunque el mecanismo puntual de cómo ocurre esta regulación aún no se encuentra bien definido (Cordes *et al.*, 2003). El proceso de inyección requiere la presencia de ciertas proteínas denominadas efectoras, las cuales se ubican en el extremo distal de la aguja, permitiendo la formación de un poro, denominado translocón, en la membrana de la célula blanco (Blocker *et al.*, 1999). En *Shigella flexnerii* se ha descrito y comprobado experimentalmente que son tres las proteínas efectoras (IpaB, IpaD e IpaC) que en conjunto se disponen en el extremo del complejo aguja, permitiendo la formación del translocón en la células huésped y, por ende, el paso de proteínas de virulencia hacia su interior (Andreas *et al.*, 2007). Además, se sabe que estos efectores, al igual que los translocadores y los factores de virulencia secretados, requieren la presencia de ciertas chaperonas moleculares específicas para la estabilización previamente a la secreción (Betts *et al.*, 2004). Las proteínas secretadas por el SSTIII carecen de una señal de secreción definida, sin embargo,

para algunas proteínas tanto del sistema flagelar, como del de virulencia, se ha demostrado que la señal se localiza en el dominio amino terminal (Hueck, 1998). A pesar de esto, no ha sido posible identificar secuencias conservadas en esta región y algunos datos sugieren que es más bien una propiedad fisicoquímica, como la anfipaticidad, la que es crítica para la secreción (Lloyd *et al.*, 2002). La hipótesis de la señal de secreción en el amino terminal ha sido cuestionada y se ha propuesto que se localiza en la región 5' codificante del RNA mensajero (Anderson y Schneewind, 1997). Sin embargo, no existe evidencia directa de interacción entre el RNA mensajero y los componentes del sistema de secreción.

Los genes que codifican el SSTIII, específicamente los del aparato de secreción, se encuentran juntos, formando agrupaciones de genes en elementos genéticos móviles (Troisfontaines y Cornelis, 2005). En algunos organismos, estas agrupaciones de genes están ubicadas en plásmidos, los que son únicos para especies patógenas, no encontrándose en las mismas especies no patogénicas (*Yersinia spp.*, *Shigella flexneri*, y *Ralstonia solanacearum*). En otros patógenos las agrupaciones de genes se encuentran en el cromosoma (*Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora*, *Rhizobium fredii*, y *Xanthomonas campestris*), en regiones denominadas Islas de Patogenicidad, las que están ausentes en aquellas mismas no patógenas (Hueck, 1998).

El SSTIII más estudiado corresponde a las bacterias del género *Yersinia*, de las cuales han derivado muchos nombres de proteínas del SSTIII conservadas entre otros géneros (Hueck, 1998). Por ejemplo, *Yersinia enterocolitica* y *Yersinia pestis* presentan un plásmido común de 70 Kb (pYV) que codifica para el SSTIII (Journet *et al.*, 2003). En este plásmido están contenidos los genes de las proteínas Ysc (Yop Secretion) que son las que conforman o estructuran el aparato de secreción (complejo aguja), y las proteínas Yops ("Yersinia outer proteins"), que corresponden a proteínas secretadas por este aparato (Cornelis *et al.*, 2002), siendo las más conocidas y mejor caracterizadas proteínas del SSTIII. Los efectores Yop (YopE, -H, -T, -O, -P y -M) modulan las vías de transducción de señales de las células eucariotas a las cuales infectan, además cuatro de ellos provocan la desestabilización del citoesqueleto de actina de las células blanco (Grosdent *et al.*, 2002). En otras bacterias patógenas, en las cuales también se han descrito TTSS se han encontrado proteínas homólogas a Ysc, para lo cual se ha creado la familia virtual de proteínas Ysc. Esta familia incluye al sistema Psc de *Pseudomonas aeruginosa*, el sistema Lsc de *Photobacterium*

luminescens, el sistema Asc de *Aeromonas spp*, el sistema Vsc de *Vibrio parahaemolyticus*; del mismo modo se incluyen a los sistemas Bsc de *Bordetella spp.* y el Dsc de *Desulfovibrio vulgaris* (Gophna *et al.*, 2003). Para el caso de patógenos de peces un claro ejemplo es la existencia de un SSTIII en *Aeromonas salmonicida*, el cual participa activamente en los eventos de infección (Burr *et al.*, 2002). A continuación se presenta una tabla donde se resumen las distintas familias de proteínas del TTSS conocidas hasta el momento:

Tabla N° 1: Principales SSTIII descritos hasta la fecha y su función más relevante.

Bacteria	Huésped Relevante	SSTIII	Función
<i>Aeromonas spp.</i>	Variable de acuerdo a la especie,	Ysc	Evasión de la respuesta inmune primaria
<i>Bordetella spp.</i>	Mamíferos y aves	Ysc	Regulación de la respuesta inflamatoria.
<i>Chlamydia spp.</i>	Mamíferos, aves y amebas	CHLAMY	Invasión y/o mantención de un nicho intracelular
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Mamíferos (esporádico)	SSA-ESC/INV-MXI-SPA	Interacción con el tráfico vesicular
<i>Edwardsiella tarda</i> , <i>E. ictaluri</i>	Peces y humanos	SSA-ESC	Sobrevivencia y replicación en macrófagos de peces.
<i>Salmonella enterica ser. typhimurium</i>	Mamíferos, incluyendo al hombre	SSA-ESC (SPI 2)	Sobrevivencia y replicación en fagocitos
<i>Shigella spp.</i>	Mamíferos, incluyendo al hombre	INV-MXI-SPA	Invasión y sobrevivencia intracelular; estimula la respuesta proinflamatoria
<i>Vibrio spp.</i>	Asociados a diversos organismos marinos; <i>V. cholerae</i> y <i>V. parahaemolyticus</i> son patógenos humanos	HRC-HRP1 Ysc	Interacción con organismos marinos Citotoxicidad (<i>in vitro</i>)
<i>Xanthomonas spp.</i>	Plantas	HRC-HRP2	Derrotar a la defensa basal; sobrevivencia y replicación el en huésped
<i>Yersinia spp.</i>	Roedores, humanos y salmónidos (<i>Y. ruckeri</i>)	SSA-ESC INV-MXI-SPA	Sobrevivencia y multiplicación en macrófagos. Invasión del huésped.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Plantas, humanos, insectos y nemátodos	Ysc	Inhibición de la fagocitosis y citotoxicidad.
<i>Photobacterium luminescens</i> , <i>P. asymbiotica</i>	Nemátodos e insectos	Ysc	Sobrevivencia en el hemocele de insectos.

2.2.5 Sistema de Secreción Tipo IV (SSTIV).

El SSTIV está ancestralmente relacionado con la maquinaria de conjugación bacteriana (Christie *et al.*, 2005). Es homólogo a los sistemas de conjugación y al sistema VirB/D4 de *Agrobacterium tumefaciens*, que facilitan la translocación del plásmido Ti hasta las células del huésped (Thanassi y Hultgren, 2000). Este sistema es un transportador versátil, debido a que es capaz de secretar tanto ácidos nucleicos como proteínas, por lo que es considerado como un sistema bastante diverso, ya sea por la variedad de sustratos que exporta como en la promiscuidad con el tipo de célula huésped (Ward *et al.*, 2002). En la figura 3, se puede observar un esquema de la diversidad de moléculas que este sistema exporta.

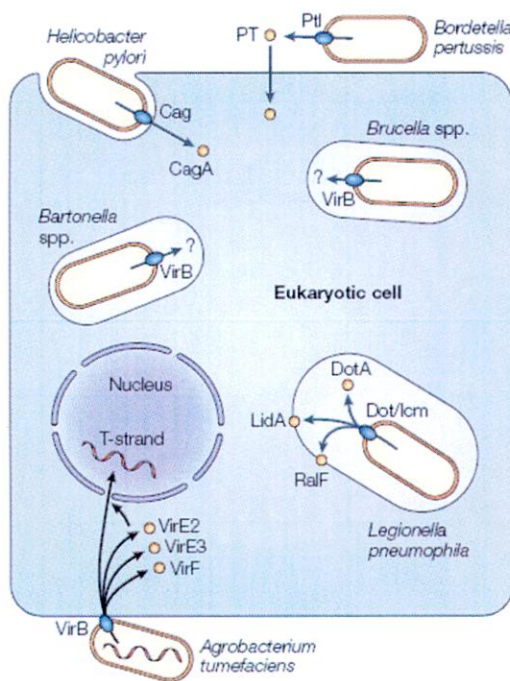


Figura 3: Esquema representativo de la gran versatilidad de este sistema de secreción, en cuanto a la diversidad de sustratos que exporta (Cascales y Christie, 2003).

En muchas especies bacterianas este sistema funciona como un mecanismo de conjugación para transferir DNA entre bacterias. La conjugación es un proceso mediado por este sistema y es el responsable del intercambio genético entre bacterias, contribuyendo a la diseminación de genes de resistencia a antibióticos y de virulencia, entre otros (Christie, 2001). Este sistema también permite la secreción de factores de virulencia de bacterias Gram negativas patógenas hacia el citoplasma de células de plantas, animales y humanos, provocando que las bacterias produzcan una modificación en el comportamiento de las células del huésped, para de esta forma, evadir las defensas del huésped (Baron *et al.*, 2002). En patógenos intracelulares el SSTIV es requerido para el establecimiento y

mantención de la bacteria en compartimentos vacuolares en las células huésped (Schulein y Dehio, 2002; Celli *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2007). Este sistema también puede funcionar como determinante de virulencia en bacterias patógenas no intracelulares, inyectando proteínas efectoras o DNA al citoplasma de las células del organismo infectado, además se ha considerado como determinante en un amplio rango de bacterias simbiotes de plantas (Jones *et al.*, 2007).

Al presente, los esfuerzos para la secuenciación de genomas bacterianos continúan para expandir la lista de especies que contienen este sistema de secreción. En la actualidad este sistema se ha descrito para *Agrobacterium tumefaciens*, *Bartonella henselae*, *Bordetella pertussis*, varias especies de *Brucella* (*suis*, *abortus*, *melitensis*), *Campylobacter jejuni*, *Coxiella burnetii*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Rickettsia prowazekii*, *Anaplasma marginale* y *Wolbachia spp*, entre otras, en las cuales es requerido para la virulencia (Ward *et al.*, 2002; Saenz *et al.*, 2007; Torres y Backert, 2008). Curiosamente, homólogos al sistema *VirB* también están presentes en un gran número de bacterias no patógenas, entre las cuales destacan *Caulobacter crescentus*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium etli* y *Thiobacillus ferrooxidans*, pero su función aún no está del todo comprendida (Christie y Vogel, 2000).

El SSTIV consiste en un canal de translocación de sustrato que atraviesa por completo el sistema membranosos de las bacterias Gram negativas. Un filamento de superficie (pili u otra estructura similar) que se extiende desde la envoltura bacteriana (Dehlo, 2008) y que hace contacto con la célula blanco, para que posteriormente el canal de translocación se extienda para facilitar la secreción del sustrato (Christie *et al.*, 2005).

Existe un sistema de clasificación del SSTIV basado en su amplio rango de funciones: IVA, IVB y "otros" (Christie y Vogel, 2000; Juhas *et al.*, 2007). El sistema IVA lo componen proteínas homólogas en estructura y función al sistema *VirB/D4* de *A. tumefaciens*, el que permite el transporte de DNA (plásmido Ti) a las células de la planta huésped (Yeo y Waksman, 2004). El sistema tipo IVB corresponde a un grupo que se encuentra estructural y funcionalmente relacionado con el sistema *Dot/Icm* de *Legionella pneumophila*, el que está relacionado con la supervivencia intracelular del patógeno (Segal *et al.*, 2005). El sistema denominado como "otros" parece tener poca relación ancestral con los tipo IVA y IVB y se

encuentra en proceso de reclasificación una vez que el origen filogenético de sus componentes y subunidades sea mejor comprendido (Christie *et al.*, 2005).

El primer SSTIV descrito, y por ende el mejor estudiado, corresponde al sistema VirB/D4 de *Agrobacterium tumefaciens*. Este sistema está compuesto al menos por 11 proteínas (VirB1-11) codificadas en el operón *virB* y al menos una proteína, VirD4, codificada en el operón *virD*, encontrándose ambos en el plásmido Ti (Yeo y Waksman, 2004). En los últimos años las funciones y estructuras de las proteínas que componen el sistema VirB/D han logrado ser dilucidadas, por ejemplo, las NTPases consumidoras de energía VirB4, VirB11 y VirD4. (Baron *et al.*, 2002). La ATPasa VirB11 se encuentra ubicada en la membrana interna y presenta una alta homología de secuencias con las ATPasas de la familia P1E, presentes en el SSTII y con la ATPasa DotB del sistema Dot/Icm de *L. pneumophila* (Yeo y Waksman, 2004). Los componentes del pili también han logrado ser dilucidados, encontrándose la proteína estructural VirB2 y la proteína de anclaje VirB5 (Baron *et al.*, 2002). Las proteínas VirB1, VirB3, VirB6, VirB7, VirB8, VirB9 y VirB10 se ensamblan en un complejo que atraviesa desde la membrana interna hasta la membrana externa y forman el canal de translocación de sustrato (Aly *et al.*, 2008).

El sistema VirB/D4 se encuentra representado en varias otras bacterias patógenas. Por ejemplo, en los organismos rickettsiales *Anaplasma phagocytophilum* y *Ehrlichia chaffeensis* este sistema se encuentra codificado en dos operones, al igual que en *A. tumefaciens*, y es indispensable para la virulencia de ambos patógenos (Cheng *et al.*, 2008). En varias especies de *Brucella* (*B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis*), también ha sido descrito el SSTIV con proteínas tipo VirB, que están codificadas en el operón *virB* (Carle *et al.*, 2006). Se ha observado que para *B. suis* el operón *VirB* es inducido cuando la bacteria está dentro de la célula huésped, por tanto se ha concluido que el SSTIV es indispensable para la supervivencia intracelular del patógeno (Boschioli *et al.*, 2002). En cambio, para *B. abortus* parece ser que los genes *virB* son expresados constitutivamente. Para *B. suis* y *B. melitensis* la expresión del operón *virB* depende de un mecanismo regulado negativamente por quorum-sensing (Carle *et al.*, 2006). En la figura 4 se puede observar la estructura típica presente en el aparato de exportación VirB/D4.

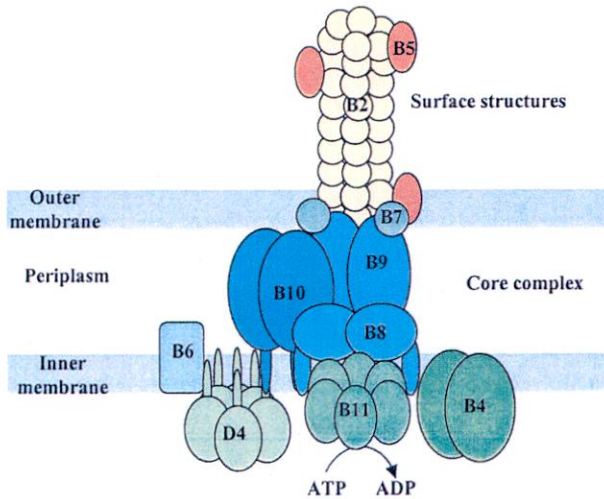


Figura 4: Modelo de la maquinaria de secreción del SSTIV (VirB/D4).

Hasta el momento se cree que las estructuras de superficie (Pili) podrían iniciar el contacto con la célula huésped, pero la vía de translocación del sustrato es aún desconocida. Este modelo refleja los conocimientos actuales sobre la interacción proteína-proteína de los componentes del SSTIV.

En *Helicobacter pylori* el SSTIV, denominado Cag, presenta algunos genes homólogos al sistema VirB. Está codificado en la Isla de Patogenicidad *cag* (*cag* PAI) (Andrzejewska *et al.*, 2006). Cag transloca la proteína CagA al citoplasma de la célula hospedera, donde estimula la señalización intracelular por interacción con varias proteínas citoplasmáticas del hospedero, como por ejemplo con el receptor c-Met de tirosina kinasa, provocando un efecto motogénico en las células del epitelio gástrico colonizadas (Oliveira *et al.*, 2006).

En *L. pneumophila* se ha encontrado la presencia de los sistemas tipo IVA y tipo IVB. El sistema IVA, denominado Lvh (*Legionella* vir homologues), es codificado por 11 vir homólogos (lvhB2, B3, B4, B5, B7, B6, B8, B9, B10, B11 y lvhD4) y está situado en una región génica con un elevado contenido de G+C, lo que sugiere que fue adquirido desde otra fuente (De Buck *et al.*, 2007). El sistema Lvh es importante para una infección celular eficiente en *L. pneumophila* creciendo a 30°C, sugiriendo un rol en la adaptación a las condiciones ambientales y cierta participación en la virulencia (Ridenour *et al.*, 2003). El sistema Lvh de *Legionella* es dispensable para el crecimiento intracelular de la bacteria en el interior de macrófagos humanos y en la ameba *A. castellanii*, pero es capaz de transferir y movilizar al plásmido IncQ de este patógeno (Segal *et al.*, 1999).

El sistema tipo IVB de *L. pneumophila*, denominado Dot (defective organelle trafficking) /Icm (intracellular multiplication), presenta no más de tres proteínas homólogas al sistema VirB de *A. tumefaciens* y de otros patógenos, pero participa activamente en la exportación de proteínas efectoras durante el proceso de infección (Christie y Vogel, 2000). Este transportador está codificado por 24 genes *dot* e *icm*, los que se encuentran agrupados en

dos regiones en el cromosoma bacteriano (Nagai y Roy, 2001). La región 1 contiene siete genes (*icmV*, *icmW*, *icmX*, *dotA*, *dotB*, *dotC* y *dotD*) y la región 2 contiene 18 genes (*icmT*, *icmS*, *icmR*, *icmQ*, *icmP*, *icmO*, *icmN*, *icmM*, *icmL*, *icmK*, *icmE*, *icmG*, *icmC*, *icmD*, *icmJ*, *icmF*, *icmB* e *icmH*) (Conover *et al.*, 2003). Los genes *dot/icm* han mostrado participar en muchos aspectos relacionados con la patogénesis de *L. pneumophila*, como por ejemplo, la fagocitosis, citotoxicidad inmediata, inhibición de la fusión lisosoma-fagosoma a tiempos tempranos de infección, asociación del fagosoma con el retículo endoplasmático, apoptosis y escape desde el fagosoma (Zusman *et al.*, 2003). *L. pneumophila* causa la muerte de las células hospederas por dos mecanismos, (i) induciendo la apoptosis en macrófagos y células del epitelio alveolar por activación de la caspasa 3 y (ii) mediante la formación de poros en la membrana de la célula huésped provocando la lisis, siendo ambos procesos dependientes de la secreción de moléculas efectoras a través del sistema *dot/icm* (Zink *et al.*, 2002). Ciertos estudios han demostrado que la evasión de la fusión fagosoma -lisosoma requiere del trabajo conjunto de los componentes citosólicos *IcmS* e *IcmW* del sistema *Dot/Icm*, demostrándose que mutantes defectivos en uno o en ambos de los dos componentes son incapaces de replicarse en el interior de las células huésped (Ninio *et al.*, 2005). Se ha demostrado que varios efectores *Dot/Icm* de *L. pneumophila* comparten similitudes con proteínas eucariotas o contienen motivos conservados con éstas, lo que podría indicar que estos efectores podrían actuar emulando a proteínas celulares y de esta forma manipular los procesos de la célula huésped (Schroeder *et al.*, 2010). Basándose en todos los antecedentes mencionados, se puede señalar que los genes *icm/dot* son esenciales para la multiplicación intracelular y destrucción de la célula huésped en *L. pneumophila*.

El genoma de *Coxiella burnetii* contiene casi por completo el set de genes *Dot/Icm* de *L. pneumophila*, con la excepción de *icmR*. La función exacta de estos genes en *C. burnetii* aún no se ha establecido, pero se conoce que este sistema participa en la formación de la vacuola de replicación dentro de la célula huésped en (Sauer *et al.*, 2005). Adicionalmente, se ha visto con claridad que estos genes son solamente expresados durante los procesos de infección a la célula hospedera (Zamboni *et al.*, 2003). Recientes estudios han demostrado que en *C. burnetii* muchos genes secretados por el sistema *Dot/Icm*, aquellos que juegan un rol importante en la modificación de las funciones celulares de la célula huésped, están codificados en su plásmido críptico, lo explica claramente porque este patógeno mantiene el plásmido (Voth *et al.*, 2011).

Semejante a los dos SSTIV de *L. pneumophila*, en *Bartonella* se ha encontrado la presencia de tres tipos de SSTIV, que corresponden a VirB/VirD4, VBH (VirB Homologues) /TraG y TRW, que son de gran importancia en la virulencia y patogenicidad de esta especie (Dehio, 2008).

La tabla 2 presenta un resumen en donde se resalta la importancia del SSTIV en los patógenos en que mejor se ha descrito este sistema. Se puede observar claramente la gran versatilidad de este sistema en relación a los diferentes tipos de moléculas que exporta.

Tabla N° 2: Resumen de las funciones del SSTIV en los patógenos de alto impacto.

SISTEMA	SUSTRATO	CONSECUENCIAS DE LA SECRECIÓN
Conjugación plasmidial	Transferencia de intermediarios (ssDNA) unidos al 5' terminal de la transesterasa; RecA; primasa; SSB.	Diseminación de genes de virulencia y resistencia a antibióticos; transferencia de proteínas que facilitan el establecimiento de plásmidos.
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (transferencia de T-DNA)	T-DNA (ss T-DNA/VirD2); VirE2; VirF.	Oncogénesis; liberación de T-DNA al núcleo de células vegetales.
<i>Bordetella pertussis</i> (Ptl)	Toxina pertussis	ADP-ribosilación de proteínas de unión a GTP
<i>Helicobacter pylori</i> (Cag)	Proteína CagA (145 kDa)	Reordenamiento del citoesqueleto de la célula huésped; fosforilación en tirosina de CagA.
<i>Legionella pneumophila</i> (Dot/Icm)	DotA; Ralf; LidA.	Permite la supervivencia intracelular en macrófagos; previene la fusión fagosoma-lisosoma.
<i>Legionella pneumophila</i> (Lvh)	Plásmido IncQ	Transferencia plasmidial
<i>Brucella</i> , <i>Bartonella</i> , <i>Rickettsia</i>	Efactor desconocido	Permite la supervivencia intracelular

2.2.6 Autotransportadores (Sistema de Secreción Tipo V –SSTV-).

A través de este sistema se exportan proteínas con diferentes funciones incluyendo proteasas, toxinas, adhesinas e invasinas. Los autotransportadores representan una vía Sec-dependiente ya que utilizan la maquinaria Sec para atravesar la membrana interna bacteriana (Koster *et al.*, 2000); sin embargo, las proteínas no requieren de factores adicionales para transitar del periplasma hacia el exterior celular, como su nombre lo indica, dirigen su propia exportación. El extremo carboxilo terminal de la proteína dirige la secreción de la región amino terminal a través de la membrana externa (Thanassi *et al.*, 2000). El ejemplo más importante dentro de este sistema corresponde a la secreción de la proteasa IgA1 de *Neisseria gonorrhoeae*. Esta bacteria infecta al humano y puede permanecer por periodos prolongados en los tejidos. Para escapar de la respuesta inmune del hospedero, en particular, de los anticuerpos IgA de las mucosas oral y urinaria, *N. gonorrhoeae* secreta la proteasa IgA que proteoliza dichos anticuerpos (Pohlner *et al.*, 1987).

2.2.7 Sistema de secreción tipo VI (SSTVI).

El aparato de secreción del SSTIV estructuralmente es semejante a la cola de un bacteriófago invertido y actúa inyectando proteínas efectoras directamente en el citoplasma de la célula blanco, ya sea eucariota u otra bacteria (Hood *et al.*, 2010). Las proteínas secretadas por el sistema de tipo VI carecen de una secuencia N-terminal y, por tanto, presumiblemente no entra en la vía Sec. El SSTVI es un nuevo mecanismo descrito para el transporte de proteínas a través de la envoltura celular de bacterias Gram negativas. Los componentes que han sido parcialmente caracterizados incluyen una proteína homóloga a lcmF (SSTIV), la ATPasa ClpV, una proteína reguladora denominada FHA y las proteínas de secreción VgrG y Hcp. El SSTVI es claramente un factor clave de la virulencia de algunas bacterias patógenas, como por ejemplo, en *Vibrio cholerae* se ha visto implicado en la translocación de potenciales proteínas efectoras en células eucariotas, al igual que en *Francisella tularensis* (Barker *et al.*, 2009). Sin embargo, este sistema está ampliamente distribuido en la naturaleza y no se limita sólo a agentes patógenos (Bingle *et al.*, 2008), *Pseudomonas aeruginosa* y en *Burkholderia thailandensis* utilizan el SSTVI para competir e interactuar con otras bacterias (MacIntyre *et al.*, 2010).

2.2.8 Sistema de Secreción Tipo VII (SSTII).

El SSTVII ha sido recientemente descrito y está presente en *Mycobacterium tuberculosis* y en bacterias Gram-positivas como *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus* y *Streptomyces coelicolor*, *Clostridium acetobutylicum* y *Listeria monocytogenes* entre otras (Burts *et al.*, 2005; Garufi *et al.*, 2008; Akpe San Roman *et al.*, 2010). El SSTVII también es conocido como sistema WXG-100, debido a que las proteínas secretadas se caracterizan por poseer un dominio aminoacídico de Tryp-aaX-Gly (WXG) de 100 aminoácidos (aa) de longitud (Simeone *et al.*, 2009). Los primeros SSTVII descritos fueron los sistemas ESAT-6 (ESX-1 y ESX-5) de *M. tuberculosis*, son responsables de secretar a las proteínas de virulencia ESAT-6 (EsxA) de 6 kDa y a CFP-10 (EsxB) de 10 kDa (Sutcliffe, 2011). El genoma de *M. tuberculosis* codifica 23 homólogos a ESAT-6, 11 de los cuales están codificados en 5 clusters de genes que también contiene varias ATPasas (Garufi *et al.*, 2008), y dos de esos clusters, ESX-1 (incluye a ESAT-6, CFP-10 y ESX-5) son importantes en la patogenicidad de *M. tuberculosis* (Abdallah *et al.*, 2007; Gey Van Pittius *et al.*, 2001). Por otro lado, en *S. aureus*, el sistema WXG-100, también llamado ESS (ESAT-6 Secretion System) es importante en la relación patógeno-hospedero y en el establecimiento de infecciones persistentes (Burts *et al.*, 2005; Burts y Missiakas, 2008).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La gran importancia económica que tiene la salmonicultura en Chile hace necesario el conocimiento de los mecanismos de invasión utilizados por los patógenos que la afectan. Esto con la finalidad de hallar nuevas alternativas profilácticas y preventivas que permitan la disminución y en lo posible la erradicación de las enfermedades que perjudican gravemente la producción de salmónidos. Como se ha observado en muchos casos de medicina humana y en el mundo veterinario, la prevención de enfermedades infecciosas se debe al resultado del conocimiento de factores de virulencia y de otros mecanismos de patogenicidad de los agentes etiológicos. Un ejemplo de claro de esto ha sido el descubrimiento de que los patrones de metilación del ADN en muchas bacterias patógenas tienen suma importancia en los mecanismos asociados a la infección. Varios reportes han señalado que alteraciones en los niveles de expresión de las Dam MTasas (enzimas que metilan el ADN en bases de adenina) en varios organismos, como *Salmonella enterica*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Vibrio cholerae* atenúan la virulencia de éstas, debido principalmente a un efecto pleiotrópico en la expresión génica (Low *et al.*, 2001; Julio *et al.*, 2001). En *Yersinia pseudotuberculosis* la sobreexpresión de Dam produce atenuación en la virulencia del patógeno (Julio *et al.*, 2001; Palmer *et al.*, 1998) y en *Salmonella typhimurium* una delección del gen *dam* reduce la invasión y la citotoxicidad *in vitro*. Además, *in vivo* estos mutantes colonizan a los organismos pero no logran invadir a los eritrocitos y causar la enfermedad (Honma *et al.*, 2004). Estos descubrimientos han posibilitado el desarrollo de las denominadas “vacunas vivas” que corresponden a bacterias mutantes en el gen *dam* (*dam*-) que son “no virulentas” y que han sido utilizadas en pruebas de vacunación con notable éxito.

Otro ejemplo de la importancia del conocimiento de los mecanismos de patogenicidad de ciertas bacterias es el descubrimiento de los factores de adherencia de cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas, lo que permitió desarrollar vacunas efectivas que impiden la adhesión del patógeno a la células blanco, controlando la diarrea neonatal del bovino (Smith *et al.*, 1994). También, con la definición de varias toxinas producidas por ciertas bacterias, tales como *Corynebacterium diphtheriae* y *Clostridium tetani*, se ha conseguido la preparación de anatoxinas, que hoy en día son empleadas exitosamente en programas inmunoprofilácticos (Cerdeña-Tárraga *et al.*, 2003).

Para el caso particular de *P. salmonis*, hasta el momento es insuficiente el conocimiento de las estrategias que utiliza para colonizar las células del huésped. El principal factor que ha imposibilitado los estudios acerca de los mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia de la bacteria es que no se había logrado su crecimiento en algún medio bacteriológico. La mantención de la bacteria en líneas celulares eucariotas, específicamente de peces, conlleva a la contaminación recurrente con componentes celulares del huésped (ADN, mitocondrias y proteínas entre otros). En la actualidad es posible el crecimiento y mantención de la bacteria en medios altamente enriquecidos (Mauel *et al.*, 2008; Mikalsen *et al.*, 2008; Gómez *et al.*, 2009, Yañez *et al.*, 2012), hecho que abre las puertas para avanzar en la investigación de este patógeno e incluso posibilitaría el crecimiento en biomasa de la bacteria para la producción de vacunas a base de bacterinas o de bacterias mutantes no infectivas.

Como ya ha sido mencionado, son bastante escasos los reportes existentes en los que se describan aspectos relevantes acerca de la biología de *P. salmonis*, como también, alguna estrategia de invasión utilizada durante la infección. Para el caso de factores de virulencia, el conocimiento es prácticamente nulo. Entre los reportes existentes se encuentra el hallazgo, mediante anticuerpos específicos, de ciertas proteínas homólogas al aparato de exportación del Sistema de Secreción Tipo III (SSTIII) (Wilhelm *et al.*, 2005), el cual corresponde al sistema de patogenicidad más conservado evolutivamente en bacterias Gram Negativas para realizar la exportación de toxinas y moléculas que faciliten la invasión a la célula huésped o de factores de virulencia (Galán *et al.*, 1999). Los mismos autores posteriormente señalan la presencia de ciertas proteínas flagelares, pero no existen nuevos reportes en que hayan vuelto a retomar este tema.

Otro reporte interesante de un mecanismo de invasión utilizado por *P. salmonis* ha sido la descripción, mediante microscopía electrónica, de un sistema de adhesión de la bacteria denominado PAC (*Piscirickettsia salmonis* attachment complex), que correspondería a prolongaciones de la membrana externa de la bacteria, a modo de pseudópodos; los autores señalan que este mecanismo estaría involucrado en la penetración del patógeno a través del epitelio intacto de los peces en cultivo (Larenas *et al.*, 2003). Pero no se puede descartar que estas prolongaciones observadas por microscopía correspondan al aparato de secreción de alguno de los sistemas antes mencionados.

Recientemente se ha descrito la existencia de una isoforma de *P. salmonis*, genéticamente diferente de la cepa tipo LF-89, por análisis de la secuencia espaciadora del operón ribosomal (región ITS). Esta nueva forma presenta un tamaño mucho menor que la cepa tipo, pero es altamente infectiva. La isoforma ha sido recuperada *in vitro* desde cultivos celulares con más de 30 días post-infección, mediante filtros de 0,22 μm . Del mismo modo, logró ser recuperada desde hígados de peces naturalmente infectados, utilizando el mismo sistema de filtrado para su obtención. Los autores han descrito a esta variante, denominada s.Ps. (Small *P. salmonis*), como una forma de la cepa LF-89, probablemente sería parte de una estrategia de sobrevivencia de la bacteria en respuesta a condiciones limitantes de crecimiento y que además podría ser la responsable de la transmisión horizontal de la enfermedad (Rojas *et al.*, 2008).

Asimismo, se ha descrito la estructura del lipopolisacárido (LPS) de la bacteria. En este reporte se señala que la forma de lípido A encontrado en el LPS de *P. salmonis* corresponde a la hexaacyl, la misma encontrada en la familia *Enterobacteriaceae*. Esta similitud podría explicar el alto poder endotóxico de *P. salmonis*, como ocurre en varias cepas de *Escherichia coli* y *Neisseria meningitidis* (Vadovic *et al.*, 2007).

A los antecedentes mencionados se suma un nuevo reporte en el que se confirma que *P. salmonis* es capaz de sobrevivir y replicarse en el interior de células del sistema inmune, macrófagos de trucha arcoiris (McCarthy *et al.*, 2008). Se observó que la bacteria era capaz de mantenerse dentro de vacuolas en el interior de los macrófagos, incluso en el interior de fagolisosomas. Además, se reportó una forma de replicación semejante a la gemación, predominante a la fisión binaria reportada anteriormente para el patógeno (McCarthy *et al.*, 2008). Sumándose a este reporte, en el Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular (GIM) de la PUCV se ha logrado el crecimiento y mantención de la bacteria en la línea celular RTS11 de monocitos/macrófagos de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Rojas *et al.*, 2009). La bacteria es capaz de generar una infección masiva en células RTS11, causando la muerte del cultivo a 15 días post-infección. Estos antecedentes hacen dilucidar que *P. salmonis* es capaz de evadir el sistema inmune del huésped, para posteriormente provocar la enfermedad.

Basándose en el estudio en donde *P. salmonis* se replica en el interior de células del sistema inmune, se visualiza que la bacteria está utilizando algún mecanismo de virulencia para evadir la fagocitosis y poder multiplicarse para generar la infección. Un suceso similar ocurre con los patógenos *L. pneumophila* y *C. burnetii*, los que son capaces de evadir al sistema inmune logrando escapar de la digestión en los macrófagos por un mecanismo que utiliza al sistema de secreción tipo IV (sistema Dot/Icm) (Segal *et al.*, 2005). Además, se ha visto que el sistema de secreción tipo IV es la herramienta clave para la supervivencia intracelular de muchos patógenos, como *Rickettsia*, *Brucella* y *Ehrlichia* (Jones *et al.*, 2007). Pero no se puede descartar que otro sistema esté siendo utilizado para este mecanismo, ya que se ha visto que el SSTIII también participa en la invasión de los patógenos a las células blanco. Un reporte adicional, conlleva a no descartar la presencia del SSTIII en *P. salmonis*, siendo capaz de modular y producir el proceso apoptótico en células *in vitro* (Rojas *et al.*, 2010), es un mecanismo gobernado por moléculas secretadas vía este sistema de secreción en muchas bacterias Gram-negativas, aunque el SSTIV también tiene relación con apoptosis en otros organismos como *L. pneumophila*.

Con todos los antecedentes anteriormente expuestos, este trabajo propone la búsqueda de los Sistemas de Secreción tipo III y/o IV en *P. salmonis* con la finalidad de lograr un mejor entendimiento sobre la biología de este patógeno. Además, este nuevo conocimiento significaría una gran proyección para la búsqueda de nuevas alternativas preventivas para disminuir la SRS en la industria salmonera nacional, conllevando a la elaboración de una vacuna totalmente eficaz.

En el mundo veterinario, en la actualidad, la finalidad de las vacunas es incrementar la producción de animales confinados en cultivo (ganadería y acuicultura). Este objetivo ha dado lugar a diferentes enfoques para el desarrollo de vacunas veterinarias partiendo por el diseño de vacunas basadas en extractos crudos de patógenos, a base de antígenos recombinantes o quiméricos, formulaciones de vectores antigénicos, patógenos inactivados por procesos químicos (bacterinas y virinas), hasta llegar a las conocidas inyecciones de ADN o vacunas de ADN (Meeusen *et al.*, 2007). Como fue anteriormente señalado, un nuevo tipo de vacuna, denominada "vacuna viva" ha sido descrito para las bacterias *Salmonella enterica* y *Yersinia pestis* por medio de *knock out* de genes (Heusipp *et al.*, 2007). Por estos motivos, el conocimiento de los factores de virulencia conlleva a aumentar las posibilidades del desarrollo de nuevas estrategias para la generación de vacunas. La

utilización de bacterias vivas no infectivas en vez de bacterias formalinizadas es una gran ventaja, ya que se estaría evitando el daño que el tratamiento puede llegar a provocar sobre los antígenos de superficie de la bacteria. De esta manera, una de las mayores proyecciones biotecnológicas de esta propuesta es llegar a la generación de nuevas vacunas, con un alto grado de efectividad, por medio del *knock out* de los genes que participan en los mecanismos de evasión del sistema inmune del huésped y en la supervivencia intracelular del patógeno. Este hecho se ve favorecido por los nuevos estudios del crecimiento de la bacteria en medios bacteriológicos.

4. HIPÓTESIS.

Piscirickettsia salmonis contiene en su genoma al menos uno de los sistemas de secreción más conservados de los organismos patógenos cercanos filogenéticamente, el cual sería uno de los mayores mecanismos de virulencia y patogenicidad de la bacteria ya que permitiría su supervivencia intracelular y favorecería su multiplicación para generar una infección productiva en el huésped.

5. OBJETIVOS.

5.1 OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar los principales genes de los sistemas de secreción más conservados de las bacterias patógenas en *Piscirickettsia salmonis* y determinar su importancia en el proceso infeccioso mediante diferentes herramientas moleculares.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Evaluar la presencia de los Sistemas de Secreción Tipo I, II, III, IV, V y VI en el genoma de *Piscirickettsia salmonis*, los que pudieran tener cierta relevancia en la virulencia y patogenicidad de la bacteria.
2. Realizar una comparación de los niveles de expresión de los genes de secreción en diferentes condiciones de crecimiento de *Piscirickettsia salmonis*.
3. Determinar la importancia de los genes de virulencia encontrados en la patogenicidad de la bacteria mediante la generación de organismos *knock out*.

6. METODOLOGÍA

6.1 CULTIVO DE PISCIRICKETTSIA SALMONIS

6.1.1 Cultivo en placas.

P. salmonis cepa LF-89 (ATCC VR-1361) fue cultivada rutinariamente en placas de agar sangre (5 g/l peptona, 5 g/l extracto de levadura, 15 g/l triptona, 10 g/l glucosa, 12 g/l de agar y 5% de sangre de cordero), suplementadas con 0,1% L-cisteína, a 20°C (modificado de Mael *et al.*, 2008).

6.2.2 Cultivo en medio líquido.

Fue necesario el desarrollo de un medio de cultivo líquido para el crecimiento de la bacteria para las experiencias posteriores. Debido a que no existía un medio de cultivo líquido descrito, se realizaron pruebas de crecimiento en diferentes medios.

A) Blood Broth (BB) (Gómez *et al.*, 2009)

El primer medio de cultivo líquido diseñado se basó en los componentes del agar sangre (5 g/l peptona, 5 g/l extracto de levadura, 15 g/l triptona, 10 g/l glucosa y 0,1% de L-cisteína), pero suplementado con 5% de sangre de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Para la preparación de este nuevo medio, denominado Blood Broth (BB), se debió coleccionar sangre de especímenes de trucha arcoíris libres de *P. salmonis* en la salmonicultura Río Blanco (Región de Valparaíso, Chile). La sangre obtenida, en presencia de heparina (anticoagulante), fue sonicada en hielo con un disruptor celular (Microson) con 4 pulsos de 15 segundos cada uno a 11 rms. Luego el lisado fue centrifugado a 11000 rpm a 4°C por 30 minutos. El sobrenadante fue rescatado y filtrado dos veces con filtros de 0.22 µm y guardado a 4°C hasta su posterior uso en la preparación del medio de cultivo.

Los cultivos en medio BB fueron iniciados a partir de una colonia de *P. salmonis* crecida en agar sangre, la que fue resuspendida en 500 µl de PBS 1x y usada para inocular 50 ml de medio BB, incubando el cultivo por 13 días a 20°C. El crecimiento del cultivo fue monitoreado cada 24 horas realizando medición de la absorbancia a OD₆₀₀ en espectrofotómetro.

Adicionalmente, se determinó la infectividad de la bacteria crecida en este medio, en la línea celular CHSE-214 (ATCC CRL-1681). La línea celular CHSE-214 fue rutinariamente propagada a 17°C en Medio Mínimo Esencial MEM (Gibco) suplementado con 15 mM HEPES, 10 mM Bicarbonato de Sodio y 7,5 % suero fetal bovino FBS (Gibco). La infección fue realizada en placas de 6 pocillos que contenían células CHSE-214 con un 80% de confluencia. Se realizaron diluciones seriadas del cultivo de 10^{-1} a 10^{-4} , de las que se usaron 100 μ l para infectar las células. Los cultivos infectados fueron incubados a 20°C y monitoreados en microscopio cada 2 días para determinar la aparición de efecto citopático (CPE).

B) Medio Definido (DMEM F-12)

Debido a que el medio DMEM-F12 (Invitrogen), medio utilizado para el cultivo de diferentes líneas celulares eucariotas, es altamente nutritivo y está suplementado con todos los aminoácidos, además de tener glucosa como fuente de carbono y energía, contiene minerales, vitaminas y cofactores, se ensayó el crecimiento de *P. salmonis* en éste. La única modificación realizada a este medio de cultivo fue la adición de glucosa extra para llegar al 1%. El cultivo en este medio fue realizado a partir de una colonia de *P. salmonis* crecida en agar sangre resuspendida en 1 ml del mismo medio, el que se usó para inocular un matraz con 50 ml de medio DMEM-F12. El cultivo fue incubado a 20°C y a 100 rpm de agitación por 13 días. El crecimiento del cultivo fue monitoreado cada 24 horas por turbidimetría, realizando mediciones de absorbancia (OD_{600}) en un espectrofotómetro.

La infectividad de *P. salmonis* crecida en DMEM-F12 también fue determinada en la línea celular CHSE-214 bajo las mismas condiciones descritas previamente.

C) Medio Marino (Difco):

Debido a que *P. salmonis* es un patógeno de salmónidos cuando éstos se encuentran durante el crecimiento en el mar, se probó este medio debido a que presenta concentraciones de sales semejantes al ambiente en el cual se encuentra la bacteria. Adicionalmente, este medio es suplementado con peptona y extracto de levadura como fuente de carbono y energía (ver composición en Anexo 1).

Los cultivos en medio marino se realizaron a partir de una colonia de *P. salmonis* crecida en agar sangre, la que fue resuspendida en 1 ml de medio marino. La resuspensión bacteriana

fue utilizada para inocular 50 ml de medio marino, cultivo que fue incubado por 48 horas a 20°C y 100 rpm de agitación. El crecimiento del cultivo fue monitoreado cada 4 horas por turbidimetría, realizando mediciones de absorbancia (OD_{600}) en un espectrofotómetro.

D) Medio Complejo (MC1)

Durante las pruebas con diferentes medios de cultivos para el crecimiento *P. salmonis* se encontró una solicitud de patente de la empresa farmacéutica noruega Pharmaq (Patente WO/2008/002152), en la que se describen 5 formulaciones de medios para el cultivo del género *Piscirickettsia*, además de las condiciones de cultivo ideales (ver tabla 1). Se enayaron las 5 formulaciones de los medio de cultivo descritos, seleccionando aquella formulación que produjo un mayor crecimiento. Los cultivos fueron realizados a 20°C y a 100 rpm de agitación, midiendo el crecimiento de la bacteria por turbidimetría a una OD_{600} de absorbancia en un espectrofotómetro.

Se seleccionó el medio PQ1 como base para el desarrollo de un nuevo medio de cultivo para el patógeno, el que debería tener un mayor rendimiento en biomasa en menor tiempo de cultivo. Al nuevo medio, llamado MC1 (Medio Complejo 1) se incorporó una fuente de fierro, ya que los medios de cultivo en placas por Mauel *et al.*, 2008 y Mikalsen *et al.*, 2008, utilizan como componente importante sangre o hemoglobina, los que deberían estar aportando principalmente fierro disponible al medio, el cual sería crítico para el crecimiento de la bacteria. Como fuente de fierro en el MC1 se utilizó sulfato ferroso ($FeSO_4$), que fue agregado en una baja proporción (0,08 g/l). Además, se determinó la importancia de la fuente de carbono y energía al medio de cultivo, por tanto se probó el crecimiento de la bacteria en un medio sin carbohidratos. En el MC1 la cantidad de extracto de levadura fue reducido a la mitad de la que contiene el medio PQ1 y la caseína fue reemplazada por peptona de carne. Además, se cambiaron las cantidades de algunas sales y se adicionaron otras con la finalidad de tamponar el medio. La composición del medio MC1 está presentada en la Tabla 3.

El cultivo de *P. salmonis* en el nuevo medio MC1 se realizó por 48 horas a 20°C y 100 rpm de agitación, utilizando como inóculo una colonia crecida en agar sangre, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. El crecimiento bacteriano fue determinado por turbidimetría a una OD_{600} de absorbancia en un espectrofotómetro, realizando mediciones del crecimiento cada 4 horas.

Adicionalmente, la infectividad de la bacteria crecida en MC1 fue determinada en la línea celular CHSE-214 como fue descrito anteriormente.

Tabla 3: Composición de medios de cultivo MC1 y formulaciones de Pharmaq evaluados para el crecimiento de *P. salmonis*.

Compuestos	MC1	PQ1	PQ2	PQ3	PQ4	PQ5
Extracto de levadura	7 g/l	15 g/l	-----	15 g/l	15 g/l	15 g/l
Caseína	-----	5 g/l	-----	5 g/l	5 g/l	5 g/l
Peptona	5 g/l	-----	-----	-----	-----	-----
Triptona	-----					
Glicerol 85%	-----	10 g/l	-----	-----	-----	-----
NaCl	10 g/l	10 g/l	-----	10 g/l	10 g/l	10 g/l
MgSO ₄	0,4 g/l	0,4 g/l	-----	0,4 g/l	0,4 g/l	0,4
KCl	-----	0,8 g/l	-----	0,8 g/l	0,8 g/l	0,8 g/l
CaCl	0,081 g/l	-----	-----	-----	-----	-----
K ₂ HPO ₄	1 g/l	0,3 g/l	-----	0,3 g/l	0,3 g/l	0,3 g/l
Sucrosa	-----	-----	-----	10 g/l	-----	5 g/l
Maltosa	-----	-----	-----	-----	10 g/l	5 g/l
FeSO ₄	0,08 g/l	-----	-----	-----	-----	-----
SF900II (Invitrogen)	-----	-----	50 ml	-----	-----	-----

6.2 EXTRACCIÓN DE ADN DE *PISCIRICKETTSIA SALMONIS*

Debido a que se presentaron problemas relacionados con la lisis de la bacteria durante los procedimientos de extracción de ADN convencionales, dando lugar a material de mala calidad y con un alto grado de degradación, se debió experimentar varios métodos de extracción.

6.2.1 Chelex-100.

Este método fue descrito por Walsh *et al.*, (1991) para la extracción de ADN desde cultivos celulares y bacterias para los ensayos de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Para este propósito se tomó una colonia de *P. salmonis* crecida en agar sangre, la que fue usada para inocular un tubo que contenía 3 ml de medio MC1. El cultivo fue incubado por 16 horas a 23°C y a 100 rpm de agitación. Posteriormente, el cultivo fue centrifugado a 6000 rpm por 20 minutos a 4°C, eliminando el sobrenadante. El pellet resultante fue resuspendido en 500 µl de Chelex-100 (Biorad) al 7% y luego agitado en vortex por 2 minutos. Luego, la muestra fue incubada a 100°C en baño de agua por 15 minutos, para posteriormente ser centrifugada a 12000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante, en el que se encontraba el ADN, fue rescatado, midiendo la concentración de ADN en un espectrofotómetro Nanodrop-1000. Finalmente la calidad del ADN fue visualizada en un gel de agarosa al 1% teñido con GelRed (Biotium).

6.2.2 Extracción fenólica.

Este procedimiento fue modificado al protocolo descrito para la purificación de ADN de microalgas (Henríquez, 2006; Gutiérrez *et al.*, 2012). Para este procedimiento, se tomó una colonia de *P. salmonis* para inocular 3 ml de medio MC1, incubando a 23°C y 100 rpm de agitación. Posteriormente, los 3 ml de cultivo fueron utilizados como inóculo para un matraz con 50 ml de medio MC1, el que fue incubado por 24 horas en las mismas condiciones descritas anteriormente. Se tomaron 20 ml del cultivo, que fueron centrifugados a 6000 rpm por 20 minutos, para posteriormente descartar el sobrenadante. El pellet resultante fue resuspendido en 5 ml de buffer TE-NaCl pH 8,0 (10 mM Tris, 50 mM EDTA y 20 mM NaCl) y fue congelado a -80°C por 30 minutos, para luego ser descongelado a 55°C por 10 minutos, repitiendo este paso 3 veces. Posteriormente, se agregaron 500 µl de SDS 10% y 500 µl Sarkosyl al 10% mezclando por inversiones, para agregar posteriormente 100 µl de Proteinasa K (100 mg/ml) e incubar a 50°C por 1 hora. Luego de la incubación se agregaron 5 ml de fenol:cloroformo:alcohol-isoamílico (relación 25:24:1) (Winkler Ltda.), la mezcla se agitó en vortex y se centrifugó a 8000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se rescató la fase acuosa superior (5 ml aproximadamente) y se agregaron 100 µl de RNAsa A (100 mg/ml) (Omega Biotek), incubando por 1 hora a 50°C. Posteriormente, se agregaron 5 ml de fenol:cloroformo:alcohol-isoamílico, agitando la mezcla por inversiones para luego centrifugar a 8000 rpm por 10 minutos. Se rescató la fase acuosa y se agregaron 5 ml de cloroformo,

agitando por inversiones y centrifugando a 8000 rpm por 20 minutos. Se rescataron aproximadamente 4 ml y se agregó 6 ml de isopropanol, incubando a temperatura ambiente por 30 minutos, para posteriormente centrifugar a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C. Finalmente, el pellet resultante fue lavado con 10 ml de etanol 75%, luego centrifugado a 12000 rpm por 20 minutos y después de ser secado a 65°C el ADN fue resuspendido en 200 µl de agua libre de nucleasa (IDT DNA Technologies). La concentración de ADN fue determinada en un equipo Nanodrop-100 y la muestra fue visualizada en un gel de agarosa al 1% teñido con GelRed.

6.2.3 Extracción de ADN con Kit E.Z.N.A. Bacterial DNA Kit (Omega Biotek).

Se realizó un cultivo de *P. salmonis* en un matraz con 50 ml de medio MC1, como fue descrito anteriormente. Después de 24 horas de incubación el cultivo fue separado en 5 tubos con 10 ml cada uno, los que fueron centrifugados a 6000 rpm por 20 minutos a 4°C. Para lograr la completa lisis de la bacteria y obtener una buena calidad de ADN en la extracción, los pellets fueron congelados a -80 por media hora y descongelados a 65°C por 15 minutos, repitiendo 3 veces este paso. Posteriormente, los pellets ya descongelados fueron resuspendidos en 500 µl de buffer TE-NaCl, se agregó 20 µl de lisozima 50 mg/ml (Omega Biotek), 5 µl de Mutanolisina 5U/µl (Sigma-Aldrich) y 5 µl de lisostafina 1 µg/µl (Sigma-Aldrich), incubando las muestras por 1 hora a 37°C. Finalmente, se procedió a continuar con el protocolo descrito por el fabricante del Kit E.Z.N.A. Bacterial DNA Kit (Omega Biotek). Una vez terminado el procedimiento, la concentración de ADN fue determinada en un equipo Nanodrop-100 y las muestras fueron visualizadas en un gel de agarosa al 1% teñido con GelRed.

6.3 EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE LOS GENES DE LOS SSTI, II, III, IV, V Y VI EN EL GENOMA DE *PISCIRICKETTSIA SALMONIS*

Para la búsqueda de genes relacionados con los diferentes sistemas de secreción se utilizaron diferentes estrategias.

6.3.1 Diseño de cebadores degenerados

Debido a la nula información acerca de la secuenciación del genoma de *P. salmonis* y por ende de genes involucrados en alguno de los sistemas de secreción, fue necesario el diseño de cebadores degenerados con la finalidad de lograr amplificar y secuenciar los genes más relevantes de éstos, y de esta forma discriminar cuales están presentes en el genoma de la bacteria.

Para el diseño de los cebadores de cada sistema de secreción, se seleccionaron los genes de las proteínas más importantes para la secreción, entre las que están ATPasas, proteínas de pili de secreción y proteínas estructurales clave para el ensamblaje de las distintas maquinarias de secreción (Tabla 4).

Tabla 4: Genes blanco utilizados para el diseño de cebadores degenerados para los diferentes sistemas de secreción.

Sistema Secreción	Gen	Función
SSTI	<i>hlyD</i>	Proteína de fusión de membrana
SSTI	<i>hlyB</i>	ATPasa (Transportador ABC)
SSTII	<i>pulE/gspE</i>	ATPasa
SSTII	<i>pulD</i>	Proteína del pili de secreción
SSTIII	<i>lcrD</i>	ATPasa
SSTIII	<i>mixA</i>	Proteína estructural aguja secreción
SSTIII	<i>ipaB</i>	Proteína de contacto (secretón)
SSTIII	<i>ipaC</i>	Proteína de contacto (secretón)
SSTIII	<i>ipaD</i>	Proteína de contacto (secretón)
SSTIV-A	<i>virB11</i>	ATPasa
SSTIV-A	<i>virB2</i>	Monómero pili secreción
SSTIV-A	<i>virB5</i>	Proteína del pili de secreción
SSTIV-A	<i>virB4</i>	ATPasa
SSTIV-B	<i>dotB</i>	ATPasa
SSTIV-B	<i>icmK/dotH</i>	Proteína de membrana externa
SSTIV-B	<i>icmF</i>	Proteína transmembrana
SSTIV-B	<i>icmW</i>	Proteína citoplasmática

En todos los casos se seleccionaron genes de organismos cercanos filogenéticamente a *P. salmonis*, como es el caso de *Legionella pneumophila*, *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, entre otros (Las secuencias específicas utilizadas y sus números de acceso se encuentran en el Anexo 2). En primera instancia, se realizaron alineamientos múltiples de las secuencias aminoacídicas codificadas por los genes blanco seleccionados, con el fin de identificar regiones conservadas. Posteriormente, se alinearon las secuencias de nucleótidos de estas regiones y se dispusieron las degeneraciones teniendo en cuenta el porcentaje de consenso en cada posición y la cercanía filogenética de los organismos alineados. Finalmente, los cebadores fueron validados mediante el programa “Oligo calculator” (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligo.html>). Todos los cebadores diseñados en esta etapa del trabajo están listados en el anexo 3.

6.3.2. Amplificación de los genes blanco con cebadores degenerados

Los cebadores degenerados diseñados anteriormente fueron utilizados para la amplificación por PCR de los genes descritos en la tabla 4. Como templado se utilizaron 20 ng de ADN de *P. salmonis* extraído por el método de Chelex-100. Todas las reacciones de PCR realizadas contenían: 1x Buffer PCR, 3 mM MgCl₂, 125 nM de cada cebador (Forward y Reverse), 425 μM de mix de nucleótidos o dNTP's (adenina, timina, citocina y guanina) y 5U de Taq DNA Polimerasa (GoTaq-Flexi DNA Polymerase, Promega). En una primera instancia, para la reacción de PCR se utilizaron las temperaturas de “annealing” de los cebadores entregadas por el programa oligo calculator, pero debido a que se estaba trabajando con cebadores degenerados era esperable obtener varias amplificaciones inespecíficas, por lo cual fue necesario realizar gradientes de temperatura para redefinir las temperaturas óptimas para la amplificación de los genes blancos. Para todos ellos se realizó una gradiente de temperatura de “annealing” desde 53° a 60°C. Los resultados fueron visualizados en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed.

6.3.3 Clonamiento y secuenciación de las secuencias amplificadas

Las secuencias blanco que lograron ser amplificadas por PCR fueron clonadas para su posterior secuenciación. A pesar de haber realizado un gradiente de temperatura para el PCR, de igual forma se obtuvo más de un amplicón con algunos sets de cebadores. Por tal

motivo, se purificó desde el gel el producto de PCR del tamaño esperado, y se utilizó el kit E.Z.N.A. Gel extraction kit (Omega Biotek) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

Todos los productos de PCR, ya sean purificados desde el gel o directo desde la reacción de PCR, fueron clonados en el vector pCR 2.1 TOPO TA (Invitrogen). Se hizo una reacción de clonamiento que contenía 2 µl de producto amplificado, 1 µl de 2 M NaCl, 1,2 µl de agua libre de nucleasas y 0,8 µl del vector; la reacción fue incubada por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los 5 µl de la reacción de clonamiento fueron agregados a 100 µl de bacterias quimiocompetentes de *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen), incubándose por 30 minutos en hielo, para luego realizar un shock térmico a 42°C por 45 segundos. Después de 2 minutos de incubación en hielo se agregaron 250 µl de medio Luria Bertani (LB) libre de antibióticos, incubando en agitación (250 rpm) a 37°C por una hora. Finalmente, se agregaron 17 µl de X-Gal (Promega) a los cultivos, los que fueron sembrados en forma homogénea en placas de agar LB suplementadas con 50 µg/ml del antibiótico Kanamicina (Km) e incubadas por 16 horas a 37°C. De las colonias resultantes se seleccionaron solamente las de color blanco, las que fueron resembradas en placas LB suplementadas con 50 µg/ml de Km y sometidas a PCR utilizando los cebadores universales M13 para determinar la presencia de los insertos. La reacción de PCR se realizó con las mismas concentraciones de reactivos descritos anteriormente y con las siguientes condiciones de temperatura: 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto, y una extensión final a 72°C por 5 minutos. Los resultados del PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed.

Las colonias que resultaron positivas al PCR fueron sembradas en 5 ml de medio LB líquido suplementado con 50 µg/ml de Km e incubadas por 16 horas a 37°C para realizar la extracción plasmidial. Los plásmidos fueron purificados de las distintas cepas por Miniprep utilizando el Kit E.Z.N.A Minikit II (Omega Biotek) según protocolo descrito por el fabricante. Adicionalmente, para asegurar en un 100% que las colonias seleccionadas contenían inserto los plásmidos purificados fueron digeridos con la enzima de restricción *EcoRI*, la que permite escindir el inserto clonado en el vector pCR 2.1 TOPO TA. La reacción de digestión contenía 1x de buffer *EcoRI*, 1 µg de ADN plasmidial y 20U de *EcoRI* y fue realizada en un volumen de 25 µl e incubada por 2 horas a 37°C. Finalmente los resultados de las digestiones fueron visualizados en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed. Los vectores purificados fueron enviados a secuenciación a Macrogen Inc., Corea.

6.3.4 Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas en el paso anterior fueron analizadas utilizando el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), perteneciente al Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) de E.E.U.U., corresponde a un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN, ARN o de proteínas. El programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) es capaz de comparar una secuencia problema contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en la base de datos, ya sea del NCBI, EMBO o Expasy, y de esta forma el algoritmo encuentra las secuencias de la base de datos que tienen mayor parecido a la secuencia problema (Altschul *et al.*, 1997).

En una primera instancia, las secuencias fueron analizadas utilizando el algoritmo BLAST de nucleótidos (BLASTN), el cual permite hacer la comparación de la secuencia problema con otras secuencias nucleotídicas encontradas en las bases de datos. De los resultados obtenidos en el análisis con BLASTN se seleccionaron las secuencias de ADN que tuvieran un porcentaje de cobertura superior al 80% con las secuencias problemas y con un valor “e” no superior a -30. Las secuencias seleccionadas fueron utilizadas para realizar un alineamiento múltiple de secuencias con las secuencias problemas utilizando el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) (Larkin *et al.*, 2007). Finalmente, los resultados de los alineamientos fueron procesados con el software Jalview (Clamp *et al.*, 2004).

Posteriormente, las secuencias problema fueron sometidas a un segundo análisis de identidad, esta vez utilizando el programa BLASTX, que usa como entrada una secuencia de nucleótidos, la que es traducida en sus seis posibles marcos de lectura (tres marcos de lecturas por hebra) y compara estas secuencias traducidas contra una base de datos de proteínas. Al igual que con BLASTN, en esta ocasión se seleccionaron las secuencias de proteína que tuvieran un porcentaje de cobertura superior al 80% con las secuencias problemas y con un valor “e” no superior a -30. Posteriormente, las secuencias seleccionadas fueron sometidas a un alineamiento múltiple de secuencias con las secuencias problema con el programa ClustalW y los resultados fueron procesados con el software Jalview.

6.3.5 “Long Range PCR” (LR-PCR)

Debido a la dificultad de encontrar otras secuencias relacionadas con SSTIV al utilizar la estrategia de PCR con cebadores degenerados, se optó por realizar un PCR de largo alcance o “Long Range PCR”. Esta técnica consiste en amplificar grandes regiones de ADN utilizando una ADN polimerasa de largo alcance.

Debido a que no se conocían grandes regiones del genoma de *P. salmonis* para diseñar cebadores, se usaron como referencia dos marcadores. El primer marcador utilizado fue el gen de la proteína inmunogénica ChaP.s (Marshall *et al.*, 2007) y el otro marcador fue la región espaciadora del operón ribosomal (Internal Transcribed Spacer- ITS) (Marshall *et al.*, 1998). Se realizó una combinación de cebadores de ChaP.s, ITS y del gen putativo de la ATPasa DotB (SSTIV) en diferentes reacciones de PCR. Las combinaciones utilizadas fueron las siguientes:

1. DotB-Forward + FF9 (ChaP.s Forward)
2. DotB-Forward + R8 (ChaP.s Reverse)
3. DotB-Reverse + FF9 (ChaP.s Forward)
4. DotB-Reverse + R8 (ChaP.s Reverse)
5. DotB-Forward + RTS1 (ITS Forward)
6. DotB-Forward + RTS4 (ITS Reverse)
7. DotB-Reverse + RTS1 (ITS Forward)
8. DotB-Reverse + RTS4 (ITS Reverse)

Todas las reacciones de PCR se realizaron en 50 µl, utilizando como templado 100 ng ADN de *P. salmonis* purificado por el método de extracción fenólica descrito anteriormente. Las reacciones de PCR contenían 200 nM de cada cebador, 1x buffer PCR, 500 µM dNTPs y 2,5U de polimerasa PfuUltra™ high-fidelity DNA Polymerase (Stratagene). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 92°C por 5 minutos, 30 ciclos de 92° por 10 segundos, 51°C (ITS/DotB) o 58°C (ChaP.s/DotB) por 30 segundos y 68°C por 12 minutos. Los resultados del

PCR fueron visualizados cargando 10 µl de cada reacción en un gel de agarosa al 1% teñido con Gel Red.

Se seleccionó el producto amplificado de mayor tamaño y los 40 µl restantes fueron cargados en un gel de agarosa al 1% para purificar la banda con el kit E.Z.N.A Gel Extraction Kit (Omega Biotek). El ADN purificado fue utilizado como templado para PCR con los cebadores de ITS (RTS1/RTS4) y de DotB (Forward/Reverse) para comprobar que esas secuencias estuvieran contenidas en ese fragmento de gran tamaño. Una vez visualizado el resultado en un gel de agarosa, el producto del LR-PCR fue parcialmente digerido con 2 unidades de la enzima de restricción *Sau3AI* (New England Biolabs) por 10 minutos a 37°C.

Posteriormente, se realizó una librería genómica con la digestión de *Sau3AI* en el vector pBluescript SK+ (Fermentas) previamente linearizado con la enzima de restricción *BamHI* (Promega) y desfosforilado con Fosfatasa Alcalina (Promega). La ligación fue realizada en 20 µl en presencia de la enzima T4 ADN Ligasa (Promega), incubando a 22°C por 4 horas. Posteriormente, el producto de ligación fue usado para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* TOP10 (descrito anteriormente) y luego sembrado en placas LB suplementadas con 100 µg/ml Ampicilina (Amp) en presencia de X-Gal. Las colonias blancas resultantes fueron seleccionadas y resembradas en medio líquido LB suplementado con 100 µg/ml Ampicilina para la posterior purificación de plásmidos, tal como se describió anteriormente. Los plásmidos purificados fueron enviados a secuenciación en Macrogen Inc., Corea.

Los resultados de la secuenciación fueron analizados utilizando los programas BLASTN, BLASTX y ClustalW, tal como fue descrito anteriormente.

6.3.6 Búsqueda de genes de secreción en el plásmido de *P. salmonis*

En el Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso existe evidencia de un megaplásmido (pPsal-GIM) en *P. salmonis* (Marshall *et al.*, manuscrito en preparación). Como ha sido mencionado en la introducción, el SSTIII puede estar codificado en el cromosoma bacteriano o bien en un plásmido en la región llamada Isla de Patogenicidad. Por este motivo se exploró la posibilidad de que el plásmido pPsal-GIM codificará los genes que componen la maquinaria de secreción del SSTIII

Para lograr este cometido, se realizaron 4 cultivos en matraces con 50 ml de medio MC1. Se inició un cultivo de 25 ml de medio MC1 con una colonia extraída de agar sangre y se incubó por 24 horas a 23°C y 100 rpm de agitación. Posteriormente, 4 matraces con 50 ml de medio MC1 fueron inoculados con 5 ml de este cultivo y se incubaron por 24 horas bajo las mismas condiciones anteriores. Luego, los cultivos fueron centrifugados a 6000 rpm por 20 minutos y el pellet procesado para la extracción plasmidial utilizando el kit E.Z.N.A Plasmid Midi Kit (Omega Biotek) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración del ADN fue cuantificada en un espectrofotómetro Nanodrop-1000 y posteriormente fue visualizado en un gel de agarosa al 1% teñido con GelRed.

Con la finalidad de eliminar cualquier contaminante con ADN cromosomal, al producto del midiprep fue sometido a una gradiente discontinua de Cloruro de Cesio (CsCl) de tres fases (59%, 44% y 35% de CsCl) en presencia de bromuro de etidio (tubos de 15 ml), según protocolo descrito por Sambrook (2001). La gradiente fue centrifugada por 20 horas a 18°C y a 28000 rpm (155800 g) en una ultracentrífuga Sorvall® WX Ultras Series (Thermo), utilizando un rotor SuperSpin 630. La separación del ADN cromosomal del ADN plasmidial fue visualizada en un transiluminador de UV. El ADN plasmidial fue extraído con una jeringa, procurando no arrastrar ADN cromosomal. El bromuro de etidio fue removido de la muestra realizando lavados con Alcohol Isoamílico, según protocolo descrito por Sambrook (2001). El ADN fue precipitado con etanol absoluto a 4°C por 12 horas, posteriormente centrifugado a 13000 rpm a 4°C, lavado con etanol 75% y resuspendido en 200 µl de agua libre de nucleasas. La concentración de ADN fue cuantificada en un espectrofotómetro Nanodrop-1000, y posteriormente fue visualizado en un gel de agarosa al 1% teñido con GelRed. Finalmente la muestra fue enviada a secuenciación a la compañía SeqWright, EEUU, y procesada por el método de pirosecuenciación Roche 454.

Los resultados de la secuenciación de pPsal-GIM fueron analizados con el servidor Softberry (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>), utilizando el algoritmo FgenesB. FgenesB es un software que permite predecir genes (ORFs, Open Reading Frames) y operones bacterianos y está basado en el modelo de cadena de Markov para seleccionar regiones codificantes y sitios de término (Tyson *et al.*, 2004). Los productos de los ORF's predichos por FgenesB fueron utilizados para ser analizados con el programa BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), que permite comparar una secuencia de proteína con las similares encontradas en bases de datos, usando el mismo principio de BLASTN y BLASTX. Se seleccionaron las secuencias de proteínas que tuviesen un porcentaje de

cobertura superior al 80% con las secuencias problema y con un valor "e" no superior a -30. Posteriormente, las secuencias seleccionadas fueron sometidas a un alineamiento múltiple de secuencias con las secuencias problema con el programa ClustalW y los resultados fueron procesados con el software Jalview.

6.3.7 Secuenciación parcial del genoma de *P. salmonis*

Como se mencionó anteriormente y debido a ciertos problemas relacionados con la estrategia de utilizar PCR con cebadores degenerados, en especial por la amplificación de algunos productos inespecíficos, se optó por otras estrategias para la búsqueda de genes relacionados con los sistemas de secreción. En conjunto con el Dr. Karl Klose, durante la pasantía de este trabajo de Tesis Doctoral, en el South Texas Center for Emerging Infectious Diseases de la Universidad de Texas, San Antonio (UTSA) en EEUU, se comenzó a trabajar en la secuenciación del genoma de *P. salmonis*.

Para realizar la secuenciación del genoma se utilizó ADN de *P. salmonis* de la mejor calidad posible, para este propósito se utilizó el método de extracción de ADN E.Z.N.A Bacterial DNA Kit (Omega Biotek). La secuenciación fue realizada en un secuenciador GS-FLX 454 (Roche), el que utiliza la tecnología de pirosecuenciación.

Los resultados de la primera ronda de secuenciación fueron analizados en la plataforma RAST (Rapid Annotation Using Subsystem Technologies) (<http://rast.nmpdr.org/>). RAST es una plataforma automatizada que permite analizar genomas de bacterias y archeas, identificando proteínas codificadas, ARNt y ARNr, asignando funciones a los genes predichos, logrando armar rutas metabólicas. Además, los genomas en análisis de la plataforma RAST pueden ser utilizados para realizar comparaciones con otros genomas que se encuentren en la plataforma SEED del sistema RAST (Aziz *et al.*, 2008). De esta manera, se inició la búsqueda de genes homólogos a diferentes sistemas de secreción en el genoma de *P. salmonis*. Utilizando la plataforma RAST, se realizaron comparaciones con otros organismos del grupo Gammaproteobacteria, específicamente con *F. tularensis*, *L. pneumophila*, *C. burnetii*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, entre otros. Esta comparación fue realizada con la finalidad de determinar el grado de conservación de la organización genómica de *P. salmonis* con otros organismos del grupo Gammaproteobacteria, en relación a los sistemas de secreción. Adicionalmente, algunas regiones de ADN que contenían operones relacionados con los sistemas de secreción fueron evaluadas con FgenesB de

Softberry, con la finalidad de corroborar los datos obtenidos por RAST. Finalmente, las secuencias de proteínas de sistemas de secreción predichas por RAST y FgenesB, fueron analizadas por BLASTP y ClustalW como fue descrito previamente, para la determinación de los porcentajes de similitud con secuencias homólogas encontradas en las bases de datos. Adicionalmente, los resultados de genes de diferentes sistemas de secreción obtenidos por RAST fueron analizados con SoftBerry para corroborar los datos.

6.4 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE SECRECIÓN/VIRULENCIA EN PISCIRICKETTSIA SALMONIS

Con la finalidad de determinar que los genes de secreción encontrados en el genoma de *P. salmonis* estaban transcripcionalmente activos y que además, contenían diferentes patrones de expresión en diferentes condiciones ambientales, se determinó el nivel de expresión de éstos a través de RT-PCR y RT-PCR en Tiempo Real (QRT-PCR). Los genes involucrados en los sistemas de secreción tipo I y II fueron evaluados netamente por RT-PCR convencional, en cambio los genes del SSTIV fueron evaluados por QRT-PCR) debido a que éste es uno de los sistemas que más relación tiene con la patogenicidad bacteriana y más aun, porque se ha visto que responden a diferentes condiciones ambientales (Boschioli *et al.*, 2002).

Adicionalmente, ciertos genes importantes en la cascada de expresión de los genes flagelares fueron evaluados por RT-PCR convencional. Cabe mencionar que se ha propuesto que la motilidad bacteriana podría ser considerada como otro factor determinante en la virulencia, específicamente relacionado con la adherencia a las células blanco (Giron *et al.*, 2002).

6.4.1 EXPRESIÓN GENES SSTIV DOT/ICM

La evaluación de la expresión de los genes del sistema Dot/Icm fue realizada en 4 condiciones diferentes:

A) Infección de las líneas celulares RTS11 y Sf21

La línea celular RTS11 es derivada de células del sistema inmune de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y está formada por dos poblaciones celulares, monocitos en

suspensión y macrófagos formando monocapa (Ganassin y Bols, 1998). La línea celular RTS11 fue mantenida rutinariamente en botellas de cultivo de 25 cm² en medio Leibovits L-15 (Gibco), suplementado con 15% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco) a pH 7,3 y a 20°C.

Previamente ha sido descrita la capacidad de *P. salmonis* de infectar la línea celular Sf21 (insecto), obteniéndose altos títulos bacterianos después de 15 días post-infección (Birkbeck *et al.*, 2004). La línea celular Sf21 fue mantenida en botellas de cultivo de 23 cm² con medio Grace's Insect Culture Medium (Biological Industries) suplementado con 20% FBS a pH 7,2 y a 20°C.

Se realizó una cinética de infección en las líneas celulares RTS11 y Sf21 de 24, 48 y 72 horas, con la finalidad de determinar la expresión de los genes *dot/icm* en tiempos tempranos de infección. Para ello, una colonia de *P. salmonis* crecida en agar sangre fue usada para inocular 3 ml de medio MC1, los que fueron incubados a 23°C y 100 rpm hasta llegar a una OD₆₀₀ de 0,4 (14 horas aproximadamente). Posteriormente 100 µl del cultivo de *P. salmonis* fueron usados para infectar botellas de RTS11 y Sf21, las que fueron cosechadas para la extracción de ARN a las 24, 48 y 72 horas post-infección. Para cada tiempo de infección se realizaron 2 réplicas biológicas. En cada punto de la cinética de infección las células fueron recolectadas desde las botellas de cultivo con un "cell scraper" y se centrifugaron en su mismo medio a 1500 rpm (300 g) por 10 minutos a 4°C. El pellet resultante fue procesado para la extracción de ARN con el agente Trizol® (Invitrogen) según indicaciones del fabricante.

Para la síntesis del ADNc se utilizaron 2 µg del ARN extraído de las líneas celulares infectadas, los que fueron tratados con la enzima DNAsa RQ1 (Promega), en un volumen de reacción de 10 µl, por 30 minutos a 37°C para eliminar cualquier posible contaminación con ADN. Después de haber inactivado a la DNAsa a 65°C por 10 minutos se comenzó a realizar síntesis del ADNc con el kit de síntesis Affinity Script QPCR cDNA Synthesis (Agilent), utilizando random primers (hexámeros). La reacción de síntesis fue realizada en un volumen final de 30 µl que contenían: 2 µg de ARN, 1x de cDNA Synthesis Master Mix, 3 ng de random primers y 5U de AffinityScript RT/ RNase Block enzyme mixture. La reacción fue realizada en un termociclador utilizando las siguientes condiciones de temperatura: 25°C por 5 minutos y 42°C por 45 minutos. Posteriormente el ADNc fue guardado a -80°C hasta su posterior uso.

La cuantificación del número de copias de los genes *dot/icm* fue realizada por QRT-PCR utilizando cuantificación absoluta de la expresión génica, debido a que aún no se ha descrito un marcador genético en *P. salmonis* que mantenga estable su expresión en diferentes condiciones para poder ser utilizado en cuantificación relativa. Como gen “housekeeping” se utilizó la secuencia ITS del operón ribosomal. Se determinó la expresión de los genes *dotB*, *dotA*, *icmE* e *icmK*, para los cuales se diseñaron cebadores que generen un producto de 300 pb (ver Tabla 5 con los cebadores).

Tabla 5: Cebadores utilizados para QRT-PCR de los genes *dot/icm*.

Gen Blanco	Nombre cebador	Secuencia
<i>dotB</i>	Ps-DotB-For	5'-GCT ACA TCT CAA TTT CTT GAC CAT TTC-3'
<i>dotB</i>	Ps-DotB-Rev3	5'-GCA TTA GTG CCG ACG ATT ACA GG-3'
<i>dotA</i>	Ps-DotA-For1	5'-CAC TCG GCA AAT TAA GCA GTT GAG-3'
<i>dotA</i>	Ps-DotA-Rev1	5'-GCG ACA TAA GTT GGA TCA AGA AAT TTC T-3'
<i>icmE</i>	Ps-IcmE-F	5'-GCC TTG GTT AAG TGT GAC CGT TG-3'
<i>icmE</i>	Ps-IcmE-Rev1	5'-GCT GTC ATT ACC TGC ATT AGA TCA TAG-3'
<i>icmK</i>	Ps-IcmK-F	5'-GCG CCA GAG CAG ATA CAT CAG TAT AAA G-3'
<i>icmK</i>	Ps-IcmK-R1	5'-GCC ACC GGA ACA TCT AAG CCT TTT AA-3'

Para generar la curva de calibrado los genes *dotB*, *dotA*, *icmE* e *icmK*, al igual que ITS, fueron previamente amplificados por PCR y clonados en el vector pCR2.1 TOPO TA, como se describió anteriormente. Una vez purificados por Miniprep los plásmidos que contenían los diferentes marcadores, se cuantificó la concentración de ADN en un espectrofotómetro Nanodrop-1000. Se realizó una curva patrón desde 10^9 a 10^1 número de copias de cada plásmido, calculando la cantidad de ADN necesario para generar el stock de 10^9 copias utilizando el programa Finnzymes disponible *on line* (http://www.finnzymes.fi/java_applets/copy_number_calculation.html), que se basa fórmula descrita por Whelan *et al.*, 2003 para el cálculo del correcto número de copias:

$$N^{\circ} de Copias = \frac{6,02 \times 10^{23} (copias / mol) \times cantidadADN(g)}{LongitudADN(pb) \times 660(g / mol / pb)}$$

Donde, $6,02 \times 10^{23}$ es el número de Avogadro y 660 equivale a la masa molar de un par de bases de ADN.

Para el QRT-PCR se realizó una dilución 1:10 del ADNc para evitar saturación de la reacción por exceso de templado. Además, las muestras fueron cargadas en duplicado, tanto los ADNc como las diferentes concentraciones de la curva patrón. La reacción de QRT-PCR fue realizada en un volumen final de 20 μ l que contenía: 1 μ l de muestra, 1x de Brilliant III SYBR® Green QRT-PCR Master Mix (Agilent) y 300 nM de cada cebador. El QRT-PCR fue realizado en un equipo CFX96 Real Time PCR System (Biorad), utilizando el software CFX Manager 2.1 (Biorad). Las condiciones de temperatura y tiempo del PCR para los 4 genes *dot/icm* fueron las siguientes: 95°C por 3 minutos, 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 57°C por 15 segundos y 60°C por 20 segundos. Para el caso del ITS las condiciones de PCR fueron las siguientes: 95°C por 3 minutos, 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 51°C por 15 segundos y 60°C por 20 segundos.

En el análisis de datos, los valores de C_T para cada dilución fueron medidos en duplicado para las curvas de calibrado, haciendo un promedio de cada uno de ellos. Los valores promedio de C_T de cada punto fueron graficados contra el logaritmo del número de copias del templado inicial ($10^9 - 10^1$). Cada curva patrón fue generada por una regresión lineal de los puntos graficados (Log N°copias v/s Promedio C_T). Todos los análisis de datos fueron realizados utilizando el software CFX Manager (Biorad). La eficiencia de amplificación del PCR de cada curva patrón (E) fue calculada usando la pendiente obtenida en los gráficos, utilizando la ecuación descrita por Rasmussen *et al.* (2001):

$$E = 10^{\frac{-1}{\text{pendiente}}} - 1$$

Para el análisis de las muestras, la cuantificación absoluta permitió determinar el número exacto de copias de ARNm de cada gen al extrapolar los valores de C_T con los de la curva de calibrado a través de la ecuación de la recta. Los datos de número de copias de las muestras problema fueron finalmente graficadas en Excel.

B) Crecimiento de *P. salmonis* a diferentes pH

Debido a que la acidificación del fagosoma en el macrófago podría ser un factor importante que gatille la expresión o sobreexpresión de los genes de secreción, se determinó el comportamiento de éstos a pHs ácidos.

Para ello, se inició un cultivo de 3 ml de *P. salmonis* a partir de una colonia extraída de agar sangre, se incubó por 16 horas a 23°C y 100 rpm de agitación. Este precultivo fue utilizado como inóculo para iniciar un nuevo cultivo en 50 ml en medio MC1, que fue incubado por 24 horas bajo las mismas condiciones mencionadas. Posteriormente, los 50 ml de cultivo de *P. salmonis* fueron usados para iniciar un tercer cultivo en un matraz de 1 litro que contenía 150 ml de medio MC1, incubando por 12 horas bajo las condiciones ya descritas de temperatura y agitación. Del cultivo anterior se tomaron 150 ml, los que fueron divididos en 3 tubos de 50 ml cada uno y centrifugados a 6000 rpm, 4°C por 20 minutos. Después de descartar el sobrenadante un tubo fue resuspendido en 50 ml de medio MC1 a pH 7,0, el segundo se resuspendió en 50 ml de medio MC1 a pH 5,5 y el tercero en 50 ml de medio MC1 a pH 4,0. Luego, fueron traspasados a matraces de 250 ml. De esta forma se dio inicio a la cinética para determinar los niveles de expresión de los genes de secreción a diferentes pH y distintos tiempos de crecimiento. Los cultivos fueron incubados a 23°C y 100 rpm de agitación, tomando muestras de 4 ml por matraz a las 2, 4, 6 y 24 horas de incubación. Las muestras de cada punto de la cinética fueron centrifugadas a 6000 rpm por 20 minutos y el pellet procesado para la extracción de ARN con el agente TrizoLS® (Invitrogen) según indicaciones del fabricante. Posteriormente el ARN fue cuantificado en un espectrofotómetro Nanodrop-1000 y fueron guardados a -80°C hasta su posterior uso.

Para la síntesis del ADNc se utilizaron 2 µg del ARN extraído de cada uno de los puntos de la cinética, fueron tratados con la enzima DNAsa RQ1 (Promega), en las mismas condiciones descritas anteriormente. Después de haber inactivado a la DNAsa a 65°C por 10 minutos se realizó la síntesis del ADNc con el kit de síntesis Affinity Script QPCR cDNA Synthesis (Agilent), utilizando random primers (hexámeros). La síntesis fue realizada con las mismas condiciones descritas anteriormente.

La cuantificación del número de copias de los genes *dot/icm* fue realizada por QRT-PCR, utilizando cuantificación absoluta de la expresión génica para determinar el número de transcritos de cada gen. En este caso, la secuencia del ITS también fue utilizada como gen

“housekeeping”, lo que permitió determinar el comportamiento de la expresión general de genes en cada punto de la cinética en los tres pH utilizados.

La cuantificación fue realizada utilizando una curva patrón con los genes clonados en el vector pCR 2.1 TOPO TA, tal como fue descrito anteriormente. El QRT-PCR se realizó en un equipo CFX96 Real Time PCR System (Biorad) en reacciones de 20 µl que contenían 1 de muestra, 1x de Brilliant III SYBR® Green QRT-PCR Master Mix (Agilent) y 300 nM de cada cebador. Las condiciones de PCR para cada gen, al igual que el método de cuantificación y el análisis de resultados, fueron las mismas descritas para la cinética de infección en las líneas celulares.

6.4.2 EXPRESIÓN DE GENES DE LOS SSTI Y GENES FLAGELARES

La expresión de genes flagelares, SSTI y SSTII fue visualizada por RT-PCR convencional, con la finalidad de determinar si éstos se encuentran transcripcionalmente activos en *P. salmonis*.

A) Expresión de genes flagelares

Debido a que la expresión de genes flagelares es una compleja cascada que involucra una amplia gama de genes reguladores, incluyendo a varios factores sigma y a otras proteínas reguladoras hasta llegar a los genes estructurales del sistema flagelar, se seleccionaron a tres genes reguladores y a dos genes estructurales del flagelo para determinar su expresión en *P. salmonis*.

Se inició un cultivo de *P. salmonis* en 3 ml de medio MC1 usando como inóculo una colonia crecida en agar sangre. El cultivo fue incubado a 23°C por 16 horas y a 100 rpm de agitación, y se utilizó para inocular 25 ml de medio MC1. Posteriormente, se realizaron dos nuevos cultivos en 25 ml de medio MC1, los que fueron inoculados con 3 ml provenientes del cultivo anterior. Ambos cultivos fueron incubados por 16 horas con las mismas condiciones de temperatura y agitación anteriores.

Para el RT-PCR se tomaron 5 ml de cada uno de los cultivos y fueron centrifugados a 6000 rpm por 20 minutos a 4°C. El pellet resultante fue procesado para la extracción de ARN con el agente Trizol LS® según indicaciones del fabricante. El ARN fue cuantificado en un espectrofotómetro Nanodrop-1000 y fue guardado a -80°C hasta su uso.

La síntesis del ADNc fue realizada utilizando 2 µg de ARN, los que fueron previamente tratados con 2 unidades de la enzima DNAsa RQ1 (Promega) a 37°C por 30 minutos. Una vez inactivada la DNAsa a 65°C por 10 minutos el ARN fue utilizado para síntesis con la enzima reverso transcriptasa M-MLV (Promega). En primer lugar, el ARN fue mezclado con 0,5 µg de "random primers" e incubados a 70°C por 5 minutos. Posteriormente, se realizó la reacción de síntesis del ADNc en un volumen final de 25 µl, que contenía: 2 µg de ARN, 0,5 µg de random primers, 200U de M-MLV RT, 200 nM de dNTPs y 1x de buffer M-MLV. La reacción fue incubada por 1 hora a 37°C y posteriormente el ADNc fue guardado a -80°C hasta su uso.

El ADNc fue utilizado como templado en un PCR convencional para visualizar la expresión de los genes flagelares *fliA* (Factor Sigma-28), *flhF* (proteína reguladora), *fliA* (proteína reguladora), *flaB* (proteína de anclaje de flagelina) y el gen de flagelina. Como control de la expresión se utilizó el gen de la proteína inmunogénica ChaP.s (HSP60) (Marshall *et al.*, 2007). Los cebadores utilizados para la amplificación por PCR de los genes flagelares y de la proteína ChaP.s están en la tabla 6. Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen de 25 µl que contenía: 1 µl de templado, 1x buffer de PCR, 3 mM de MgCl₂, 125 nM de cada cebador (Forward y Reverse), 425 µM de dNTPs y 5U de Taq DNA Polimerasa (GoTaq-Flexi DNA Polymerase, Promega). Las condiciones para PCR de los genes flagelares fueron las siguientes: 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto; y 72°C por 5 minutos. Para ChaP.s las condiciones de PCR fueron: 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto; y 72°C por 5 minutos como extensión final. Como control positivo del PCR se utilizó ADN de *P. salmonis* extraído por el método de Chelex-100 y como blanco o control negativo se utilizó agua libre de nucleasas. Los resultados de los PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed™.

Tabla 6: Cebadores utilizados para RT-PCR genes flagelares y ChaP.s

Gen Blanco	Nombre cebador	Secuencia
<i>fliA</i>	FliA-F	5'- GTG AAG CGG GCT GAA AAG TAT GCT-3'
<i>fliA</i>	FliA-R	5'-C TTA CTC TCC ATT CAT CTG TAA CCG-3'
<i>fliA</i>	FliA-F	5'- GTT AAG CAG AGA GTG GTT ATT G-3'
<i>fliA</i>	FliA-R	5'-C TCA GGC TTT TGA CAG CTC TTC GCT-3'
<i>flhF</i>	FlhF-F	5'-G AAA ATT AAA CGG TTT TTT GCA G-3'
<i>flhF</i>	FlhF-R	5'-C TCA TAG CAC TTC TCT TCC ATG TTC-3'
<i>flaB</i>	FlaB-F	5'-GCG ATG GGA ATT TCT ATT AAT ACC AAC-3'
<i>flaB</i>	FlaB-R1	5'-CCT AAA ACA CCA GCC CTT AAA GCA-3'
<i>flagelina</i>	Flagellin-F	5'-GCA TGG CAC TTT CAG TTG TAA CCA AC-3'
<i>flagelina</i>	Flagellin-R1	5'-CTT GAC CAG TCC CCA AAG TAG CAG-3'
<i>chaP.s</i>	FF9	5'-GAT GTC AGC AAA AGA AGT GCG CTT-3'
<i>chaP.s</i>	R4	5'-G AAC TGA TTC TAA TGT GGG TAG TAA TTC-3'

B) SSTI:

Para el SSTI se realizó un RT-PCR de los genes *tolC* (proteína de membrana externa o porina), *hlyD* (proteína de canal intermembrana) y *hlyA* (α -hemolisina).

Para ello se realizó una cinética de infección en la línea celular RTS11 (monocitos/macrófagos) por 24, 48 y 72 horas, tal como fue descrito para la expresión de los genes *dot/icm* (SSTIV) en la sección anterior. Como control de expresión de éstos genes se utilizó un cultivo de 3 ml de *P. salmonis* en medio MC1, generado a partir de una colonia crecida en agar sangre. Se incubó 24 horas a 23°C y 100 rpm. Las células RTS11 infectadas fueron cosechadas con un "cell scraper" y fueron centrifugadas en su propio medio a 1500 rpm. Se procesó el pellet con el agente Trizol® (Invitrogen) para la extracción de ARN. El cultivo líquido de *P. salmonis* fue centrifugado a 6000 rpm por 20 minutos y el pellet procesado con Trizol LS® (Invitrogen). Posteriormente, se efectuó un RT-PCR, donde la síntesis del ADNc fue realizada con random primers y con la reverso transcriptasa M-MLV (Promega) en las mismas condiciones de reacción, temperatura y tiempos de incubación antes descritos. Una vez terminada la síntesis, el ADNc fue utilizado como templado para una amplificación por PCR, con cebadores diseñados para amplificar los genes *tolC*, *hlyC* y *hlyA*. Como control de expresión se utilizó el gen de la proteína inmunogénica ChaP.s. El PCR para ChaP.s fue realizado bajo las mismas condiciones de temperatura y tiempos descritos anteriormente. El PCR para los genes del SSTI fue realizado en 25 μ l bajo las siguientes condiciones: 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30

segundos, 72°C por 1 minuto; y 72°C por 5 minutos. Finalmente, los resultados fueron visualizados en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed™.

6.5 GENERACIÓN DE ORGANISMOS KNOCK OUT PARA EVALUAR IMPORTANCIA DE GENES DEL SSTIV EN LA PATOGENICIDAD

Con la finalidad de determinar la relevancia de los genes *dot/icm* en la virulencia y patogenicidad de *P. salmonis*, se evaluó el efecto del *knock out* de los genes *dotB* (ATPasa) e *icmE* (proteína transmembrana) en la capacidad infectiva de la bacteria. Para realizar el *knock out* de estos genes de secreción se seleccionó un sistema denominado TargeTron™ (Sigma-Aldrich), que ha sido ensayado con éxito en *F. tularensis*, bacteria filogenéticamente cercana a *P. salmonis* y que comparten varias características en común.

Cabe mencionar, que a la fecha no se han reportado procedimientos que permitan la transformación de *P. salmonis* con algún elemento genético extracromosomal, por lo cual la primera estrategia a realizar ha sido estandarizar una técnica que permitiera la transformación del patógeno con un vector plasmidial.

Se ha reportado que ciertos organismos patógenos intracelulares no reconocen secuencias promotoras exógenas (Rodríguez *et al.*, 2008), por tanto, para asegurar la expresión de los genes reporteros ha sido necesario generar cassettes de expresión con secuencias promotoras endógenas. En *F. tularensis* y *C. burnetti* se ha utilizado ampliamente la secuencia promotora del operón *groES-groEL* (HSP10-HSP60) (Rodríguez *et al.*, 2009) con notable éxito. En *P. salmonis* no está disponible en bases de datos pública la región promotora del operón HSP10-HSP60 (GroES-ChaP.s), ni siquiera de otro gen u operon, lo cual nos ha conllevado a identificar secuencias promotoras por dos vías diferentes.

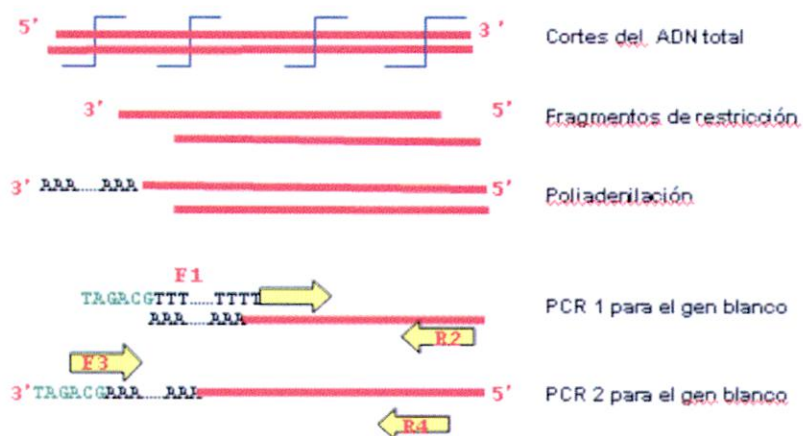
6.5.1 BÚSQUEDA DE SECUENCIAS PROMOTORAS EN EL GENOMA DE *P. SALMONIS*

Para cumplir este objetivo se realizaron dos estrategias, una correspondió al PCR RAGE (Rapid Amplification of Genomic Ends) y la otra fue realizar una librería genómica para hallar regiones promotoras de otros genes u operones.

A) RAGE (Rapid Amplification of Genomic Ends)

Esta técnica fue utilizada para encontrar las regiones promotoras del operón bicistónico conformado por los genes de las proteínas GroES y ChaP.s y también para el operón ribosomal 16S-23S. El RAGE es una técnica basada en el PCR, fue desarrollada por Cormack y Somssich (1997). Se basa en el mismo principio de la técnica RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) (Ohara *et al.*, 1989). Básicamente consiste en cortar con una o más enzimas de restricción el ADN genómico total, para luego poliadenilar, mediante la enzima terminal transferasa (TdT), los extremos 3' de los fragmentos generados. Después, se amplifica el material poliadenilado con un cebador oligo dT, que hibrida con las colas poli A, y otro cebador diseñado para hibridar con uno de los extremos del gen codificante al cual se le quiere conocer sus regiones regulatorias. Posteriormente, los amplicones se someten a un segundo PCR, esta vez con un cebador de "anclaje", que se encuentra incluido en el oligo dT ya mencionado, y otro cebador específico para el gen en cuestión, distinto al anterior (Figura 5). Esto genera amplicones específicos, los cuales pueden ser clonados y secuenciados.

Figura 5: Esquema técnica del RAGE.



ADN de *P. salmonis* purificado por el método de extracción fenólica fue utilizado para este procedimiento. Para ello se realizaron 5 reacciones de digestión (3 µg de ADN) en un volumen final de 100 µl, utilizando 30 unidades de las enzimas de restricción *Bam*HI (Promega), *Eco*RI (New England Biolabs), *Kpn*I (New England Biolabs) *Hind*III (Promega) y *Nde*I (Promega). Las reacciones de digestión fueron incubadas a 37°C por 14 horas, para obtener corte total del material genómico. Luego, la reacción fue detenida por inactivación de

la enzima a 65°C por 15 minutos, (Liu y Baird, 2001). Las digestiones fueron visualizadas en un gel de agarosa al 1% teñido con GelRed™, y se las reacciones de digestión con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. Posteriormente, el ADN digerido fue purificado con el Kit MSB® Spin PCRapace (Invitex), con la finalidad de eliminar el remanente de nucleasas y limpiar de sales la muestra. Después de haber sido cuantificado el ADN en un espectrofotómetro Nandorop-1000, se tomaron 500 ng de ADN digerido, se denaturó por 5 min a 100 °C, y se realizó la reacción de poliadenilación en 20 µl, contenían: 0.5 mM de dATP y 50U de Terminal Transferasa TdT (Promega), se incubó por 90 minutos a 37°C y finalmente, 10 minutos a 72°C. Por último, 5 µl de la reacción de poliadenilación equivalente a 100 ng del ADN fueron utilizados para el primer ciclo de PCR (RAGE1), en una reacción de 50 µl que contenía 2 µM del cebador del gen seleccionado (ChaP.s o 16S, ver tabla 7), 2 µM del cebador oligo d(T) (5'-ACCACGCGTATCGATGTCGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'), 400 µM de dNTP's, 3 mM de MgCl2 y 5U de GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega). Las condiciones para el PCR fueron: 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 1,5 minutos; 72°C por 5 minutos. Luego, 1 µl del RAGE1 se usó como templado para un segundo PCR (RAGE2), en una reacción de 50 µl de volumen total, utilizando las mismas condiciones de PCR que en el RAGE1, excepto por la presencia de un segundo cebador del gen seleccionado (ver tabla 7) y de 2 µM de un cebador de anclaje (anchor primer) (5'- GACCACGCGTATCGATGTCGAC-3'). Finalmente, los productos amplificados fueron visualizados en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed™, y posteriormente clonados en el vector pCR2.1 TOPO TA, como se ha descrito anteriormente, para su posterior secuenciación.

Tabla 7: Cebadores utilizados para el RAGE de ChaP.s y 16S.

Cebador	Secuencia	Gen Blanco
16s-F1	5'-GCT TCA GTT TCC TAA AGT TAT CCC-3'	16s
16s-F2	5'-ACT CAC CCG TCC GCC ACT CGT C-3'	16s
ChaPs-R9	5'-GAA GCG CAC TTC TTT TGC TGA CAT-3'	ChaP.s
GroES-R2	5'-CGG TCA TGT AAT GGA CGG ATT TTC AT-3'	groES

Los resultados de la secuenciación fueron analizados en una primera instancia con el programa BLASTN, con la finalidad de determinar si los productos amplificados contenían la región 5' de los genes en estudio. Posteriormente, los resultados positivos fueron alineados con ChaP.s y 16S a través del software ClustalW, como fue descrito anteriormente.

Debido a la poca cobertura de amplificación obtenida con el RAGE para ChaP.s se realizó un segundo RAGE. Como templado se utilizó ADN de *P. salmonis* digerido con las enzimas de restricción *NdeI*, *BamHI* y *KpnI*. El RAGE fue realizado con las mismas condiciones descritas anteriormente, salvo que los cebadores específicos para ChaP.s fueron cambiados por cebadores diseñados sobre la secuencia del gen de la HSP10 (GroES). Los resultados obtenidos del RAGE2 fueron clonados en el vector pCR2.1 TOPO TA y enviados a secuenciación.

Los resultados de las secuencias fueron analizadas con BLASTN y ClustalW. Adicionalmente, los datos fueron analizados en el servidor Softberry (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>), específicamente con el algoritmo Bprom, que permite la predicción de posibles secuencias promotoras bacterianas.

B) Librería genómica de *P. salmonis*

Con la finalidad de hallar otros posibles promotores de genes de *P. salmonis*, se utilizó una segunda estrategia que consistió en generar una librería genómica en el vector pBluescript SK+ (Fermentas). Se utilizaron 5 µg de ADN de *P. salmonis* purificado por el método de extracción fenólica, que fueron parcialmente digeridos con 10U de la enzima de restricción *Sau3AI* en una reacción final de 150 µl. La reacción de digestión fue incubada por 30 minutos a 37°C y la enzima inactivada a 65°C por 15 minutos. Se procedió a una extracción con Fenol:Cloroformo:alcohol-isoamílico y el sobrenadante fue precipitado con etanol frío, lavado con 75 % ETOH y finalmente el pellet resuspendido en 15 µl de agua libre de nucleasas. El vector pBluescript SK+ (3 µg) fue linearizado con 20U de la enzima *BamHI* en una reacción de 50 µl, e incubada por 12 horas a 37°C, para luego ser tratado por 1 hora a 37°C con la enzima Fosfatasa Alcalina (Promega). El ADN plasmidial linearizado fue purificado con el kit MSB® Spin PCRapace. Los dos ADN digeridos y purificados fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% teñido con GelRed™. Posteriormente, 600 ng de ADN de *P. salmonis* digerido y 300 ng de pBluescript SK+ linearizado fueron ligados en presencia de la enzima T4 ADN Ligasa (Promega), en una reacción de 20 µl que fue incubada por 16 horas a 16°C. Finalmente, la mezcla de la reacción de ligación fue usada para transformar por electroporación células electrocompetentes de *E. coli* TOP10 (Invitrogen). La selección de los transformantes se efectuó en agar LB suplementado con Ampicilina 100 µg/ml en presencia de X-Gal (Promega). En total 200 colonias blancas fueron

analizadas por PCR con los cebadores M13-F y M13-Rev, se seleccionaron solamente aquellas que tuviesen un inserto de tamaño mayor a 500 pb. Las colonias seleccionadas fueron crecidas en 5 ml de caldo LB con Ampicilina 100 µg/ml para realizar la purificación plasmidial (E.Z.N.A Plasmid Midi Kit, Omega Biotek) y proceder con el servicio de secuenciación (Macrogen Inc.).

Los resultados de las secuencias fueron analizados con los programas BLASTN y BLASTX, y permitieron seleccionar una secuencia de 992 pb que contenía dos genes putativos. La secuencia seleccionada fue posteriormente analizada en el servidor Softberry, con los programas FgenesB para determinar la presencia de dos posibles ORFs y con Bprom para buscar una región promotora dentro de ella.

6.5.2 CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN

Con la finalidad de probar diferentes orígenes de replicación de plásmidos en la bacteria, se utilizaron dos plásmidos para clonar el cassette de expresión. Uno de los vectores fue pCR2.1 TOPO TA (Invitrogen) y el otro pCU18 (Rasko *et al.*, 2007).

A) Construcción del cassette de expresión

Para la construcción del cassette de expresión se utilizó como gen reportero *cat* (Cloranfenicol acetil-transferasa) que entrega la resistencia al antibiótico Cloranfenicol.

Para comenzar la construcción del cassette se diseñaron cebadores dirigidos a amplificar al gen *cat* y a la región promotora del operón *GroES-ChaP.s* de *P. salmonis*, utilizando la herramienta "Oligo Calculator" (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>).

Los cebadores fueron diseñados con sitios de restricción para permitir la ligación entre el promotor y el vector, en el sitio *NdeI* (CATATG), y del cassette con el vector en el sitio *Sall* (GTCGAC). Los cebadores utilizados están listados en la tabla 8.

Tabla 8: Cebadores utilizados para la construcción del cassette de expresión.

Gen blanco	Nombre	Secuencia cebador
<i>cat</i>	CAT-F	5'-GCG CAT ATG GAG AAA AAA ATC ACT GGA TAT ACCAC-3'
<i>cat</i>	CAT-R	5'-GTA CTC GAG TTA CGC CCC GCC CTG CCA CT-3'
<i>groES-ChaP.s</i>	GroES-EL-F	5'-GTT GTC GAC CAA TTC AGC ATC AAG CTC TGT C-3'
<i>groES-ChaP.s</i>	GroES-EL-R	5'-GCG CAT ATG TCA TTC TTC TCC TAA AAG ATG A-3'

Tanto la secuencia promotora de *P. salmonis*, como el gen *cat* fueron amplificados por PCR con los cebadores enunciados en la tabla 8. Como templado para el promotor se utilizó ADN de *P. salmonis* extraído por el método de Chelex-100. Para el PCR del gen *cat* se usó como templado el vector pDNR-LIB (GenBank: DQ666274.1). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 50 µl, que contiene: 1x buffer de PCR, 3 mM de MgCl₂, 125 nM de cada cebador (Forward y Reverse), 425 µM de dNTPs y 5U de Taq DNA Polimerasa (GoTaq-Flexi DNA Polymerase, Promega). Las condiciones de PCR en ambas amplificaciones fueron las siguientes: 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto; y 72°C por 5 minutos. Posteriormente, 5 µl de cada reacción fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% teñido con GelRed™. Luego, los amplicones fueron purificados con el kit MSB® Spin PCRapace (Invitex), según indicaciones de manufactura, y el DNA fue finalmente cuantificado en un espectrofotómetro Nanodrop-1000.

Posteriormente, 1 µg de ADN de la región promotora de *ChaP.s* y 1µg de ADN de *cat* fueron tratados con la endonucleasa de restricción *NdeI*. El sitio *NdeI* está incluido en cada cebador. La reacción de digestión fue realizada en un volumen de 50 µl en presencia de 10U de *NdeI*, incubando a 37°C por 4 horas, para luego detener la reacción a 65°C por 10 minutos. Finalmente, el ADN fue purificado con el kit MSB® Spin PCRapace (Invitex). Después de haber cuantificado la concentración de ADN se utilizaron 500 ng de cada ADN para ser ligados entre sí en una reacción de ligación de 25 µl en presencia de 2U de T4 DNA Ligasa (Promega), incubando por 16 horas a 16°C. Finalmente, 1 µl de la reacción de ligación fue utilizada como templado para PCR, usando el cebador Forward de la región promotora y el Reverse de *cat*, con la finalidad de amplificar por completo el cassette ya ligado (Promotor *GroES-ChaP.s* + *cat*). La reacción de PCR fue realizada en 50 µl bajo las mismas

condiciones descritas para la amplificación de ambas secuencias y los resultados fueron visualizados en un gel de agarosa 1% teñido con GelRed,

B) Construcción del vector de transformación

Se utilizaron dos vectores de transformación, un vector de clonamiento comercial que fue pCR2.1 TOPO TA (Invitrogen) y el vector pCU18, donado gentilmente por el Dr. Karl Klose de la Universidad de Texas en San Antonio, EEUU.

a) pCR2.1 TOPO TA:

Este vector plasmidial contiene dos orígenes de replicación diferentes para poder ser usado en una amplia variedad de hospederos (*pUC ori* y *f1 ori*). Para la construcción de este vector, se clonó el cassette de expresión (Promotor GroES-ChaP.s + *cat*) generado en la sección anterior. El clonamiento fue realizado en un volumen de 5 μ l, según indicaciones del fabricante, los que fueron posteriormente transformados en células quimiocompetentes de *E. coli* TOPO 10, tal como se describió en secciones anteriores. La selección de los clones positivos se realizó por PCR usando los cebadores M13 forward y reverse. Con el clon positivo, se realizó un cultivo de 50 ml de medio LB suplementado con Kanamicina 50 μ g/ml, y se incubó por 12 horas a 37°C. A partir de 2 ml de cultivo, se hizo un stock del clon a -80°C en 15% de glicerol. El resto del cultivo fue utilizado para la extracción plasmidial por medio utilizando el kit de Midiprep E.Z.N.A Plasmid Midi Kit (Omega Biotek) según indicaciones de manufactura. Los resultados fueron visualizados en un gel de agarosa teñido con GelRed™ y la concentración de ADN fue cuantificada en un espectrofotómetro Nanodrop-1000.

b) pCU18:

EL vector pCU18 de (5768 pb) fue creado por la fusión de 2 plásmidos, el vector de clonamiento comercial pUC18 y un plásmido de amplio rango de hospederos aislado de *Staphylococcus aureus*, el pC194 (Rasko, 2007). Este vector ha sido probado con éxito en diferentes hospederos, incluyendo *E. coli*, *F. tularensis* y *V. cholerae* (Dr. Karl Klose, comunicación personal).

Para la construcción del nuevo vector se hizo crecer la cepa de *E. coli* TOP10 utilizada como reservorio de pCU18 en 5 ml de medio LB suplementado con 100 μ g/ml de Ampicilina por 16

horas a 37°C y 100 rpm. El cultivo fue utilizado para la extracción plasmidial con el kit E.Z.N.A Plasmid Mini kit (Omega Biotek) según indicaciones del fabricante. Una vez cuantificada la concentración del ADN purificado, se utilizaron 3 µg de pCU18 para ser linearizados con 20U de la enzima de restricción *Sall* (Promega) en una reacción de 100 µl incubada por 16 horas a 37°C, la que fue posteriormente tratada con la enzima Fosfatasa Alcalina (Promega) por 1 hora a 37°C. Luego, el vector linearizado y desfosforilado fue purificado con el kit MSB® Spin PCRapace (Invitex), cuantificada su concentración y guardado a -20°C hasta su uso.

El cassette de expresión fue extraído desde el vector pCR2.1 TOPO TA mediado por una digestión con la enzima *Sall* (Promega), en una reacción de 100 µl que contenía: 20U de *Sall*, 3 µg de pCR2.1 TOPO TA/*GroES-ChaPs+cat*) y 1x buffer R. La reacción fue incubada por 16 horas a 37°C, y luego de inactivar la enzima a 65°C por 15 minutos, los 100 µl de la reacción fueron cargados en un gel de agarosa al 1% teñido con GelRed™. Posteriormente la banda correspondiente al cassette de expresión fue cortada desde el gel y el ADN purificado con el kit E.Z.N.A. Gel Extraction Kit (Omega Biotek), según indicaciones del fabricante. Se cuantificó el ADN purificado en un espectrofotómetro Nanodrop-1000.

Se realizó una reacción de ligación de 25 µl en presencia de la enzima T4 DNA Ligasa (Promega), utilizando 300 ng del vector pCU18 linearizado y 600 ng del cassette purificado, se incubó 16 horas a 16°C. Posteriormente, se utilizaron 15 µl de la reacción de ligación para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* TOP10. Las células fueron sembradas en placas LB Ampicilina 100 µg/ml e incubadas por 16 horas a 37°C. Se seleccionaron 20 colonias, para ser analizadas por PCR con los cebadores que amplifican la región promotora *GroES-ChaP.s* con la finalidad de determinar el clonamiento del cassette de expresión en el vector. Para ello se realizó un PCR "colony picking" en 15 µl de volumen de reacción para cada colonia, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Finalmente, se seleccionó una clon positiva, que fue cultivado en 50 ml de medio LB suplementado con Ampicilina 100 µg/ml, e incubado por 12 horas a 37°C. Se realizó el stock del clon con 2 ml de cultivo en 15% de glicerol y se guardó -80°C. El resto del cultivo fue utilizado para la extracción plasmidial por medio utilizando el kit de Midiprep E.Z.N.A Plasmid Midi Kit (Omega Biotek) según indicaciones de manufactura. Los resultados fueron visualizados en un gel de agarosa teñido con GelRed™ y la concentración de ADN fue cuantificada en un espectrofotómetro Nanodrop-1000.

6.5.3 TRANSFORMACIÓN DE *P. SALMONIS*

Como se mencionó anteriormente, a la fecha no existe una metodología que permita la transformación de la bacteria *P. salmonis*, por lo cual, se buscaron diferentes estrategias de transformación, todas ellas basadas en experiencias realizadas en patógenos intracelulares facultativos u organismos cercanos filogenéticamente a *P. salmonis*.

A) Transformación química (quimiotransformación):

Se procedió a la preparación de células quimiocompetentes de *P. salmonis* iniciando un cultivo de 3 ml en medio MC1, se incubó por 24 horas a 23°C y a 100 rpm. Posteriormente, este cultivo se utilizó para inocular un matraz con 50 ml de medio MC1, el que y fue nuevamente incubado por 12 horas bajo las mismas condiciones descritas. El cultivo fue centrifugado a 6000 rpm por 20 minutos y el pellet resultante fue resuspendido suavemente en 25 ml de 0,1 M de CaCl₂ estéril y frío e incubado por 30 minutos en hielo. Luego, se centrifugó nuevamente a 6000 rpm por 10 minutos y el pellet fue resuspendido en 2 ml de 0,1 M de CaCl₂ y 15% de glicerol. Utilizando el mismo protocolo anterior, también se probó hacer células competentes con 0,1 M de MgCl₂ y 0,1 M de FeCl₂.

Para la transformación con las tres modalidades de células competentes se utilizó 1 µg de cada vector (pCR 2.1 TOPO TA/*GroES-ChaP.s-cat* y pCU18/*GroES-ChaP.s-cat*), los que fueron mezclados con 200 µl de *P. salmonis* quimiocompetente (4 reacciones de transformación independientes por vector), incubando en hielo por 30 minutos, para luego realizar un shock de temperatura a 30°C. Luego, se incubó nuevamente en hielo por 2 minutos, y se adicionó 500 µl de medio MC1 sin antibiótico a cada uno de los viales de transformación por vector. Dos viales fueron incubados por 4 horas y los otros por 12 horas a 23°C y a 100 rpm. Después de la incubación en el shaker, los cultivos fueron sembrados en placas de agar sangre que contenían 5 µg/ml de Cloranfenicol, monitoreando el crecimiento de colonias transformantes cada dos días. Adicionalmente, un vial de *P. salmonis* quimiocompetente fue incubado, en ausencia de plásmido, en las mismas condiciones anteriores y sembrada en una placa de agar sangre sin antibióticos, con la finalidad de determinar la viabilidad celular después del tratamiento.

B) Electroporación

Para la electroporación se utilizaron dos protocolos diferentes. El primero fue descrito para *L. pneumophila* y *F. tularensis* y el segundo para *V. cholerae*.

a) Protocolo 1:

En este caso las células electrocompetentes fueron preparadas iniciando un cultivo de 3 ml en medio MC1 a partir de una colonia de *P. salmonis* crecida en agar sangre. El cultivo fue incubado por 24 horas a 23°C y a 100 rpm. Este cultivo se utilizó para inocular un matraz con 50 ml de medio MC1, y se dejó creciendo por 12 horas en las mismas condiciones descritas anteriormente. El cultivo fue centrifugado a 6000 rpm a 4°C por 20 minutos y el pellet resultante fue resuspendido en 25 ml de sacarosa 0,5 M estéril y fría, centrifugando nuevamente a 6000 rpm por 5 minutos repitiendo el paso anterior 3 veces. Después de una nueva centrifugación a 6000 rpm y a 4°C el pellet fue resuspendido en 2 ml de sacarosa 0,5 M con 25% de glicerol.

Para la electroporación, se utilizó 1 µg de cada vector, que fueron mezclados con 200 µl de *P. salmonis* electrocompetentes (4 reacciones por vector). Para la electroporación se utilizó una cubeta de 0,2 mm (Biorad) y fueron electroporadas en un equipo Gen Pulser® II Electroporation System (Biorad) con las siguientes condiciones: 2,5 Kv, 600 Ω de resistencia y 25 uF de capacitancia. Se hicieron 4 réplicas por cada vector y una electroporación sin vector como control. Una vez realizada la electroporación, las bacterias fueron resuspendidas en 500 µl de medio MC1 sin antibiótico. Se procedió a incubar 2 tubos por vector por 4 horas y 2 tubos por 12 horas a 23°C y 100 rpm, en las mismas condiciones. Seguido a la incubación las bacterias fueron sembradas en placas de agar sangre en presencia de 5 µg/ml de Cloranfenicol, monitoreando el crecimiento de colonias transformantes cada 2 días.

b) Protocolo 2:

Al igual que en los casos anteriores, se inició un cultivo de *P. salmonis* en 50 ml de medio MC1, el cual fue incubado por 12 horas a 23°C y a 100 rpm. Posteriormente, el cultivo fue centrifugado a 6000 rpm a 4°C por 20 minutos. El pellet fue resuspendido suavemente en 25 ml de buffer de electrocompetencia frío y estéril (272 mM de sacarosa y 2 mM de MgCl₂)

para luego centrifugar nuevamente a 6000 rpm por 5 minutos, resuspendiendo nuevamente en buffer de electrocompetencia, repitiendo este paso 3 veces. El pellet de la última centrifugación fue resuspendido en 2 ml de buffer de electrocompetencia.

Para la electroporación, se utilizó 1 µg de cada vector que fueron mezclados con 200 µl de *P. salmonis* electrocompetentes (4 reacciones por vector). Se utilizaron cubetas de electroporación de 0,2 mm (Biorad) y fueron electroporadas en un equipo Gen Pulser® II Electroporation System (Biorad) con las siguientes condiciones: 2,4 Kv, 100-1000 Ω de resistencia y 25 uF de capacitancia. Se hicieron 4 réplicas por cada vector y una electroporación sin vector como control. Inmediatamente después de la electroporación las bacterias fueron resuspendidas en 500 µl de medio MC1 sin antibiótico, incubando 2 tubos por vector por 4 horas y los otros dos por 12 horas, todos a 23°C y 100 rpm. Después de la incubación las bacterias fueron sembradas en placas de agar sangre en presencia de 5 µg/ml de Cloranfenicol, monitoreando el crecimiento de colonias transformantes cada 2 días.

C) Biobalística:

La Biobalística básicamente consiste en introducir material genético exógeno a células mediante alta velocidad de pequeñas partículas de oro o tungsteno, las que perforan las paredes celulares y membranas y entran en las células sin destruirlas (Klein *et al.*, 1987). La Biobalística fue en un principio descrito para la transformación en células vegetales y eucariotas en general, pero también ha sido aplicada a bacterias con notable éxito, como es el caso de *Bacillus megaterium* (Aune, 2010).

Para realizar este procedimiento, en primera instancia se realizaron cultivos de *P. salmonis* para obtener alta biomasa celular. Se comenzó con 4 cultivos de 3 ml en medio MC1 a partir de colonias crecidas desde placas de agar sangre, incubados por 16 horas a 23°C y a 100 rpm. Estos cultivos fueron el preinoculo para inocular matraces con 50 ml de medio MC1 que fueron incubados por 24 horas en las mismas condiciones anteriores. Los cultivos fueron posteriormente centrifugados a 6000 rpm por 20 minutos y los pellets resultantes de cada uno de ellos fueron resuspendidos en 10 ml totales de medio MC1. La suspensión de bacterias fue utilizada para sembrar 20 placas de agar sangre, agregando 500 µl en la parte central de la placa, las que fueron incubadas por 48 horas a 20°C para aumentar la masa celular.

La obtención de los plásmidos a transformar (pCU18+cassette y pCR2.1 TOPO TA+cassette) se obtuvo a partir del cultivo de los stocks en 20 ml de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes y se incubaron durante toda la noche a 37°C y a 250 rpm. Posteriormente, la purificación plasmidial se realizó utilizando el kit E.Z.N.A Midi Kit (Omega Biotek), según indicaciones del fabricante. El ADN obtenido fue cuantificado por espectrofotometría en un equipo Nanodrop-1000 y guardado a -20°C hasta su uso.

La transformación fue realizada en un equipo Biolistic PDS-1000 (Biorad). Para el bombardeo se utilizaron partículas de Tungsteno M5 (Biorad), tratadas previamente con 3 µg de cada vector, según indicaciones del fabricante. Las bacterias fueron bombardeadas con 3 µg de ADN adherido a 600 µg de tungsteno a 1100 p.s.i. de presión y a 6 cm de distancia del extremo del lanzador de partículas. Se realizaron tres disparos por placa, bombardeando 10 placas por cada vector. Posteriormente, las placas fueron incubadas a 20°C por 48 horas para estabilizar las bacterias y luego fueron resembradas en placas de agar sangre suplementadas con 5 µg/ml de Cloranfenicol e incubadas por 20 días a 20°C monitoreando la aparición de colonias cada dos días. Adicionalmente, una alícuota de las bacterias bombardeadas fue sembrada en medio MC1 en presencia de 5 µg/ml de Cloranfenicol e incubadas a 23°C y 100 rpm de agitación hasta observar turbidez en los cultivos. Como control se bombardeó una placa sin vector pero con tungsteno M5, la que fue posteriormente resembrada en una placa de agar sangre y en medio MC1, ambos sin antibióticos.

D) Conjugación:

La conjugación fue realizada con el vector pCU18 sin el cassette de expresión, pero con la región de movilidad MOB (genes *tra*) del plásmido pRP4. El vector pCU18+MOB fue transformado en células quimiocompetentes de la cepa donadora de plásmido para conjugación *E. coli* DAPA λ -pir. Las bacterias transformantes fueron seleccionadas en placas LB Ampicilina 100 µg/ml suplementadas con 50 mM de DAPA. Una vez seleccionadas las colonias transformantes, se tomó una de ellas y se hizo crecer en 5 ml de medio LB Ampicilina 100 µg/ml suplementado con 50 mM de DAPA a 37°C y 250 rpm de agitación por 12 horas. Posteriormente, se realizó una siembra homogénea en una placa de LB Ampicilina 100 µg/ml suplementada con 50 mM de DAPA. Se tomó un inóculo de *P. salmonis* crecida por 4 días en una placa de agar sangre a 20°C, la que también fue resembrada por arrastre con una tórula (generando una línea recta del largo del diámetro de la placa) en una placa de

agar sangre suplementada con 50 mM de DAPA. Después de 24 horas de incubación del cultivo, se sembró en la misma placa la cepa *E. coli* DAPA- λ -pir que contenía a pCU18+MOB, generando una cruz con la línea sembrada de *P. salmonis*, produciendo un contacto entre ambas bacterias en la parte central de la placa, la que fue incubada por 12 horas a 20°C. Finalmente, con una tórula estéril se tomó la parte central del cultivo (mezcla *P. salmonis* y *E. coli* DAPA⁻ λ -pir) y se resembró en una placa de agar sangre en ausencia de DAPA y suplementada con 5 μ g/ml de Cloranfenicol, la que fue monitoreada para el crecimiento de colonias transformantes de *P. salmonis* cada dos días. Previo a la transformación de *P. salmonis* mediada por conjugación, el vector fue ensayado bajo las mismas condiciones experimentales en la bacteria *Francisella tularensis*, comprobando la eficiencia de la conjugación.

6.5.4 KNOCK OUT UTILIZANDO EL SISTEMA TARGETRON®

TargeTron® Gene Knock out System (Sigma-Aldrich), se basa en la aplicación de la genética reversa mediante un intrón móvil del grupo II, que se encuentra tanto en bacterias como en mitocondrias y cloroplastos. Estos intrones son retro-elementos sitio específicos, que utilizan un mecanismo de movilidad denominado "retrohoming", pudiendo movilizarse autónomamente (Chen *et al.*, 2005). Este elemento genético móvil presenta una proteína codificada por el intrón (IEP), que tiene actividad de transcriptasa-reversa, de RNA splicing (Madurasa) y también de endonucleasa. La movilidad comienza cuando la IEP facilita al intrón adoptar una conformación catalíticamente activa para promover el "splicing", resultando en la formación de un complejo intrón-IEP (RNP). El complejo RNP reconoce específicamente la secuencia de ADN blanco y promueve la integración por "splicing" inverso del intrón de ARN en una de las hebras de ADN al que va dirigido. Luego el IEP corta la otra hebra de ADN (complementaria), usándola como partidor para la transcripción-reversa del intrón recién insertado. La copia de ADNc resultante es integrada en el ADN genómico celular por recombinación o un mecanismo de reparación (Karberg *et al.*, 2001). Esta técnica ha sido utilizada con éxito para *Lactococcus lactis*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Vibrio parahemolyticus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Serratia marcescens*, *Francisella tularensis* y *Pseudomonas aeruginosa*, en donde la estabilidad se mantiene en un 100% por un alto número de generaciones (Frazier *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2008).

Debido a problemas asociados a la transformación eficiente de *P. salmonis*, se optó por generar un modelo de *Knock out* para el gen de la proteína ChaP.s, el que se encontraba clonado en el vector pBluescript SK+ (Fermentas) y resguardado en la cepa *E. coli* TOP10 (Invitrogen). Cabe mencionar que el intrón contiene un cassette de expresión que entrega resistencia al antibiótico Kanamicina, por tanto, los transformantes fueron seleccionados en presencia de ese antibiótico.

A) Construcción del vector de *Knock out*

Para el diseño de los cebadores que redirigirán la inserción del intrón al gen ChaP.s, se realizó el análisis de la secuencia con el algoritmo de diseño de cebadores de TargeTron (<http://www.sigma-geosys.com/targetron/>), indicado por el fabricante de este sistema de mutagénesis. Se seleccionaron dos sets de cebadores, aquellos con el mayor puntaje, y por ende con la mayor probabilidad de generar una inserción del intrón en el gen de ChaP.s. Los cebadores utilizados están listados en la tabla 9. La inserción del intrón fue escogida para dos posiciones dentro de la secuencia de ChaP.s, una entre los nucleótidos 272 y 273 y la otra entre los nucleótidos 1021 y 1022.

Tabla 9: Cebadores utilizados para la modificación del intrón en la secuencia de ChaP.s

Nombre	Secuencia (5'-3')
1021/IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAGGTGACCAAAATGTGCGCCAGATAGGGTG
1021/EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCCAAAATGCTAACTTACCTTTCTTTGT
1021s/EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTTTCACCTCGATAGAGGAAAGTGTCT
273/IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAAATACCGTCGCGCGTGCAGCCAGATAGGGTG
273/EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCGTCGCGGTTAACTTACCTTTCTTTGT
273/EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGTTTGTATTCCGATAGAGGAAAGTGTCT

La modificación del intrón fue redirigido a las regiones de ChaP.s seleccionadas por sistema de PCR con 4 cebadores, de los cuales 3 de ellos (IBS, EBS1d y EBS2) entregan la secuencia de sitios de reconocimiento para ChaP.s y el último es un cebador universal (EBS) del intrón. El PCR para ambas sitios de inserción en ChaP.s fue realizado, utilizando como templado ADN del intrón suministrado en el kit, en una reacción de 50 µl de volumen total en presencia de la enzima JumpStart REDTaq ReadyMix, según indicaciones del fabricante. Las condiciones de PCR fueron: 94°C por 30 segundos; 30 ciclos de 94°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos; y 72°C por 2 minutos de extensión final. Los 50 µl de cada reacción de PCR fueron cargados en un gel de agarosa al 2%, para

posteriormente cortar la banda de ADN correspondiente a 350 pb y purificarla con el kit E.Z.N.A Gel Extraction Kit (Omega Biotek). Posteriormente, el intrón modificado fue digerido con 20U de la enzima *HindIII* y 10U de *BsrGI*, en una reacción de 20 µl, incubando 30 minutos a 37°C, luego 30 minutos a 60°C y finalmente, 80°C por 10 minutos. El ADN digerido fue purificado con el kit MSB® Spin PCRapace (Invitex), según indicaciones de manufactura. Este ADN fue utilizado en una reacción de ligación en presencia de T4 DNA Ligase (Promega) con el vector pACD4K-C (Targetron Vector), previamente linearizado con las mismas enzimas de restricción. La ligación fue realizada por 16 horas a 16°C. Finalmente, el producto de la ligación fue transformado en células quimiocompetentes de *E. coli* TOP10 y sembradas en placas LB con 25 µg/ml de Cloranfenicol en presencia de X-Gal (Promega). Las colonias blancas fueron seleccionadas, su ADN plasmidial purificado y digerido con las enzimas *HindIII* y *BsrGI* para determinar la correcta inserción del intrón. Se resguardaron los clones positivos al igual que el ADN plasmidial.

B) Knock out

Para el *Knock out*, se realizó una transformación doble con el vector pBluescript SK+ChaP.s y los vectores de *knock out*, utilizando 50 ng de cada vector en células quimiocompetentes de *E. coli* TOP10. Las bacterias fueron sembradas en placas LB suplementadas con Ampicilina 100 µg/ml y Cloranfenicol 25 µg/ml, con la finalidad de seleccionar aquellas colonias que tuviesen ambos plásmidos. El vector pACD4K-C contiene la región operadora del operón *lac*, por lo cual la expresión del intrón debe ser inducida con IPTG (Isopropil Tiogalactósido).

Una vez seleccionadas las correspondientes colonias, se hicieron crecer en 5 ml de medio LB suplementado con Ampicilina 100 µg/ml y Cloranfenicol 25 µg/ml por 12 horas a 37°C. Posteriormente, 2 ml de medio LB suplementado con Ampicilina 100 µg/ml fueron inoculados con 100 µl de los cultivos anteriores y se incubaron por 2 horas con las mismas condiciones ya descritas. La inducción de la expresión del intrón fue realizada con 10 µl de un stock de IPTG a 100 mM, incubando los cultivos por dos horas a 30°C y 250 rpm de agitación. Posteriormente, 200 µl de los cultivos fueron utilizados como inóculo para sembrar 5 ml de medio LB suplementado con 25 µg/ml de Kanamicina y fueron incubados a 37°C por 12 horas, con la finalidad de seleccionar las bacterias en las que el intrón se insertó en el gen blanco. Se usó un asa de loop para tomar un inóculo de los cultivos y sembrarlos por estrías en placas LB suplementadas con 25 µg/ml de Kanamicina e incubadas a 37° por 16

horas. Para validar la inserción del intrón en la secuencia de ChaP.s se realizó un PCR de colonias utilizando el cebador FF9 (Forward) de ChaP.s y el cebador EBS-universal (Reverse) del intrón en un volumen total de 15 μ l. Las siguientes fueron las condiciones de PCR utilizadas: 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 1.5 minutos; y 72°C por 5 minutos. Los resultados fueron visualizados en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed™.

7. RESULTADOS

7.1 CRECIMIENTO DE *P. SALMONIS* EN CULTIVOS LÍQUIDOS

Se probaron 4 formulaciones diferentes de medios de cultivo líquido para el crecimiento de *P. salmonis*.

La primera formulación utilizada fue un medio cuya fórmula se basó en los componentes del agar sangre, pero se reemplazó la sangre de cordero por un lisado de sangre de trucha. El crecimiento en este medio de cultivo fue relativamente bajo, llegando a una OD_{600} de 0,272 a los 13 días de incubación (Figura 6).

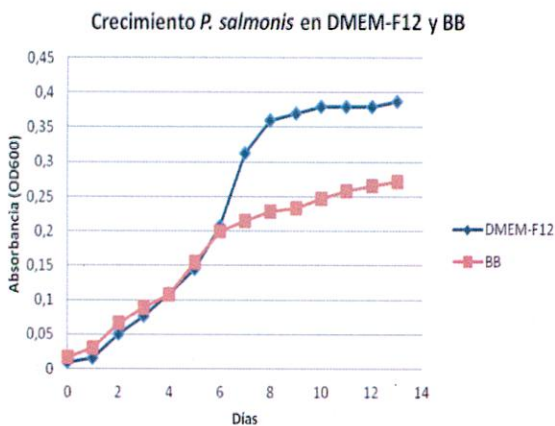


Figura 6: Curva de crecimiento de *P. salmonis* en los medios DMEM-F12 y BB hasta los 14 días de incubación.

En el caso del cultivo en medio marino, la absorbancia a una OD_{600} de 0,260 se alcanzó a las 32 horas de crecimiento, pero en tiempos posteriores los valores de absorbancia comenzaron a descender, terminando en 0,199 a las 44 horas de incubación (Figura 7). Un resultado similar se obtuvo en el crecimiento de *P. salmonis* en medio MC1, en el cual el mayor valor de absorbancia se alcanzó a las 36 horas y fue de 0,4, para luego descender llegando a 0,37 a las 44 horas de incubación (Figura 7).

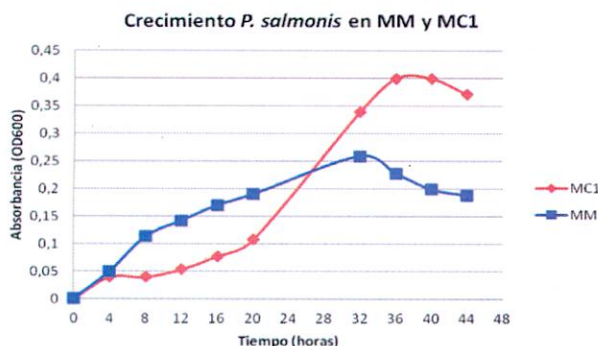


Figura 7: Curva de crecimiento de *P. salmonis* en Medio Marino (MM) y MC1. El mayor crecimiento se obtuvo alrededor de las 40 horas de incubación en ambos medios.

Como se pudo observar en las figuras 6 y 7 en los 4 medios utilizados se logró el crecimiento de *P. salmonis*. En DMEM-F12 y BB el mayor crecimiento se obtuvo a los 12 días aproximadamente, a diferencia de MM y MC1 en los cuales se logró el mayor valor de absorbancia a las 40 horas. MC1 fue el medio de cultivo en el que se obtuvo el mejor resultado de crecimiento, así como también es el medio con menor costo para la producción de biomasa de *P. salmonis*, por ese motivo fue seleccionado para el resto de las experiencias realizadas en este trabajo.

7.2 GENES DE SECRECIÓN/VIRULENCIA EN EL GENOMA DE *P. SALMONIS*

7.2.1 Genes del Sistema de Secreción Tipo I (SSTI)

Mediante la estrategia basada en PCR con cebadores degenerados se buscaron los genes estructurales *hlyD* (proteína de fusión de membrana) y *hlyB* (ATPasa, transportador ABC) del SSTI en el genoma de *P. salmonis*. Con los cebadores dirigidos a *hlyD* se obtuvo un producto de aproximadamente 500 pb del tamaño esperado (Figura 8). En este caso fue necesario realizar un gradiente de temperatura para la obtención un producto amplificado único, debido a que el uso de cebadores degenerados usualmente genera productos inespecíficos, determinando que 61°C es la mejor tempratura de annealing de los cebadores.

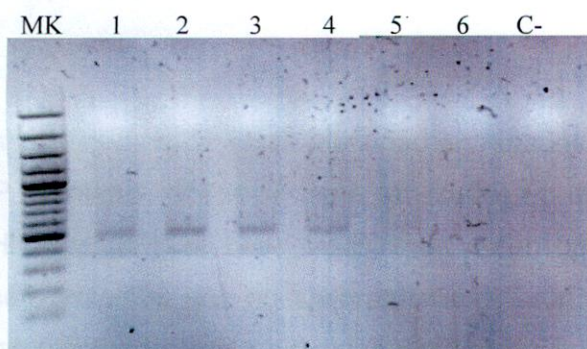


Figura 8: Gradiente de PCR para la amplificación del gen *hlyD* del SSTI con cebadores degenerados. Gel agarosa al 1%. **MK:** Marcador de ADN de 100 pb. **1-6:** ADN de *P. salmonis* amplificado a diferentes temperaturas (58 a 62°C) de "annealing".

Después del clonamiento de la secuencia amplificada en el vector pCR2.1 TOPO TA, ésta fue enviada a secuenciación. Los resultados de la secuenciación, por medio del del algoritmo BLASTN (limitando el análisis bacterias) no mostraron homología con genes del SSTI.

Al realizar el análisis de la secuencia con el algoritmo BLASTX, que traduce la secuencia de ADN y la compara con otras secuencias de proteínas de la base de datos, se obtuvo como resultado que la proteína putativa codificada en la secuencia de *P. salmonis* amplificada contiene dominios conservados con proteínas de la familia HlyD (Figura 9). El principal ejemplo de proteínas de esta familia es HlyD, la que forma parte del SSTI y forma un canal periplasmático entre el transportador ABC o ATPasa (HlyB) y la proteína de membrana externa (porina o TolC), pero otros componentes importantes de esta familia son las colicinas, CvaA (SSTV) y las proteínas de bombas de resistencia a drogas.

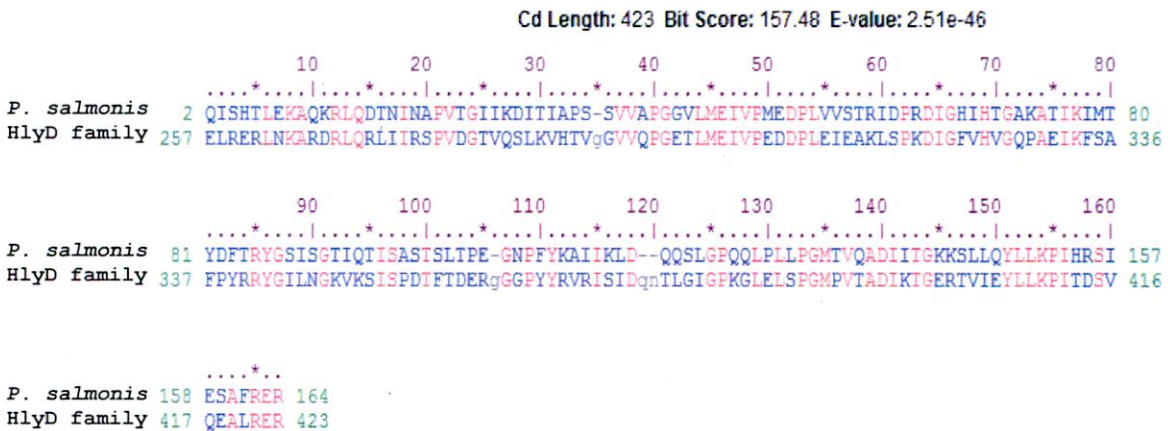


Figura 9: Resultado de BLASTX del alineamiento de secuencias para determinar dominios conservados entre la proteína putativa HlyD de *P. salmonis* y una proteína de la Familia HlyD. Los asteriscos indican los aminoácidos implicados en el dominio conservado HlyD.

Al analizar los datos de identidad entregados por BLASTX se observó que la secuencia de *P. salmonis* solamente tiene similitudes en su secuencia aminoacídica con otras proteínas HlyD del SSTI de otros organismos, no encontrándose similitud o algún grado de homología con proteínas que no tuvieran relación con el SSTI, como es el caso de la colicina que también pertenece a la familia HlyD. En la Tabla 10, se muestran las proteínas que tuvieron un mayor grado de homología con la secuencia parcial de la proteína HlyD de *P. salmonis*, seleccionando a aquellas con mayor puntaje, con un valor e superior a -30.

Tabla 10: Mayores homologías de *hlyD* de *P. salmonis* encontradas por BLASTX.

GenBank N°	Organismo	% Identidad	Valor "e"
BAI75751.1	<i>Azospirillum</i> sp. B510	41	2,00E-32
CAM77161.1	<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1	43	9,00E-31
YP_001425441.1	<i>Coxiella burnetii</i> Dugway	38	2,00E+30
EAS66398.1	<i>Vibrio angustum</i> S14	44	3,00E+30

Una vez seleccionadas las secuencias de proteínas con mayor grado de similitud a la proteína putativa HlyD de *P. salmonis* (Tabla 10), se realizó un alineamiento múltiple de secuencias con el programa ClustalW, que permitió comparar las 5 secuencias al mismo tiempo. A diferencia del resultado que entregó BLASTX en que aparecen los resultados individuales entre *P. salmonis* y cada proteína. Los resultados fueron procesados con el software Jalview, con la finalidad de mostrar los grados de conservación existente entre las secuencias (Figura 10).

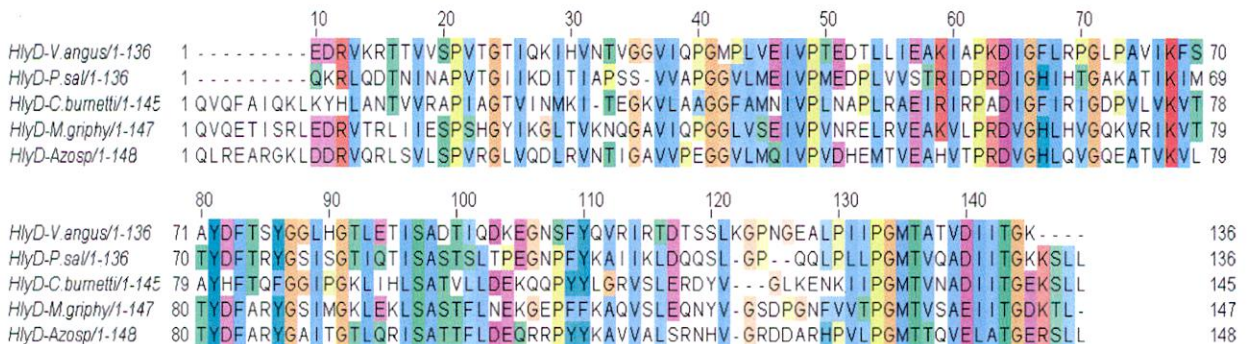


Figura 10: Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de HlyD de *P. salmonis* predicha por BLASTX con las secuencias de organismos con mayor similitud (Tabla 10). Alineamiento realizado por ClustalW y procesado por Jalview. La intensidad de los colores muestra el grado de conservación de los aminoácidos. Los colores indican aminoácidos de propiedades similares.

Cuando se amplificó el gen *hlyB* se obtuvo como resultado muchos fragmentos inespecíficos, incluso después de haber hecho una gradiente de temperatura para determinar la temperatura óptima de alineamiento del set de cebadores (Figura 11). Éstos amplicones fueron clonados en el vector pCR2.1 TOPO TA, pero al analizar los resultados de la secuenciación no se encontraron homologías con el gen *hlyB*, tanto por BLASTX como por

BLASTN. Adicionalmente, se diseñó un nuevo set de cebadores degenerados para amplificar esta secuencia, pero nuevamente los resultados fueron negativos.

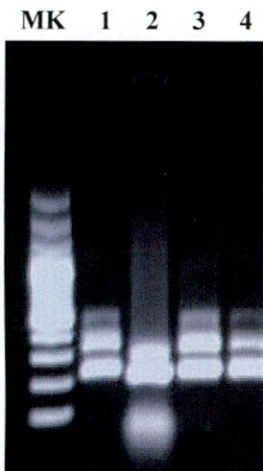


Figura 11: Gradiente de PCR para la amplificación del gen *hlyB* del SSTI con cebadores degenerados. Gel agarosa al 1%. MK: Marcador de ADN de 100 pb. 1-5: ADN de *P. salmonis* amplificado a diferentes temperaturas (59 a 62°C).

Después de analizar los resultados de la secuenciación parcial del genoma de *P. salmonis* en el servidor RAST se buscaron secuencias que tuvieran relación con el SSTI. En el contig00617 se encontró la presencia de una secuencia homóloga al gen *hlyD*. Para comprobar ese resultado, la secuencia fue analizada en el servidor SoftBerry con el software FgenesB. FgenesB busca posibles ORFs en ese contig, entregando también la secuencia de la proteína putativa. El resultado de FgenesB entregó el mismo ORFs obtenido mediante RAST en el contig00617, el que posteriormente fue analizado BLASTP para confirmar la identidad de la proteína predicha, obteniéndose nuevamente un alto grado de homología con la proteína HlyD de otros organismos. Este hallazgo confirma la presencia de esta proteína en el genoma de *P. salmonis*, corroborando el resultado obtenido anteriormente en la secuenciación del producto amplificado con los cebadores degenerados diseñados a amplificar el gen *hlyD*.

De los resultados del RAST también se buscaron otras posibles proteínas relacionadas con el aparato de secreción del SSTI, encontrándose en el contig00039 la secuencia de la proteína TolC (proteína de membrana externa o porina). Este contig también fue analizado con FgenesB y posteriormente con BLASTP para comprobar la identidad de la secuencia, obteniéndose un alto grado de homología con proteínas TolC del SSTI de diferentes organismos (Tabla 11).

Tabla 11: Mayores homologías de la proteína putativa TolC de *P. salmonis* obtenidas por el análisis con BLASTP.

GenBank N°	Organismo	% Identidad	Valor "e"
EEF79527.1	<i>Methylophaga thiooxidans</i> DMS010	38	1,00E-78
EAX32128.1	<i>Coxiella burnetii</i> MSU Goat Q177	35	8,00E-73
ABQ56510.1	<i>Legionella pneumophila</i> Corby	35	1,00E-70
EHQ51357.1	<i>Ectothiorhodospira</i> sp. PHS-1	34	2,00E-76

Una vez seleccionadas las cuatro mayores homologías en BLASTP, éstas fueron sometidas a un alineamiento múltiple de secuencias de TolC de *P. salmonis* usando ClustalW, con el fin de visualizar el grado de conservación entre ellas. Los resultados fueron procesados con Jalview (Figura 12).



Figura 12: Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de TolC de *P. salmonis* predicha por RAST y FgenesB con las secuencias de los organismos con mayor similitud encontrados en el análisis de BLASTP (Tabla 11). Alineamiento realizado por ClustalW y procesado por Jalview, la intensidad de los colores indican el grado de conservación de los aminoácidos.

Al continuar la búsqueda de genes relacionados con el SSTI en los resultados de la secuenciación del genoma de *P. salmonis* se encontró que el contig00010 contenía otro gen de alta relevancia y que se encuentra relacionado directamente el SSTI. Este nuevo marcador corresponde a un efector o proteína de exportación, la toxina α -hemolisina, que en varios organismos cercanos filogenéticamente a *P. salmonis* es secretada por el SSTI. El contig00010 fue posteriormente analizado en Softberry, con el algoritmo FgenesB, para corroborar la presencia de este ORF en la secuencia. La secuencia aminoacídica entregada por FgenesB, correspondiente al gen putativo de la α -hemolisina, fue analizada por BLASTP, obteniendo como resultado que la proteína putativa contiene un dominio conservado llamado BON, que se encuentra presente en proteínas de protección osmótica, en algunas secretinas y en las hemolisinas, que en general son proteínas bacterianas secretadas. La función de ese dominio estaría implicada en la unión a las membranas fosfolípicas. Adicionalmente, el análisis de BLASTP entregó como resultado que la proteína de *P. salmonis* tiene un alto grado de homología a algunas α -hemolisinas y a otras proteínas relacionadas con la unión a fosfolípidos (lipoproteínas) (Tabla 12).

Tabla 12: Mayores homologías de la proteína α -hemolisina de *P. salmonis* encontradas por el análisis con BLASTP. Las mayores similitudes corresponden con otras α -hemolisinas, como también con ciertas proteínas de unión a fosfolípidos o lipoproteínas.

GenBank N°	Organismo/Proteína	% Identidad	Valor "e"
EGM68490.1	<i>Shewanella</i> sp. HN-41 (α -hemolisina)	36	2,00E-33
EFP94699.1	<i>Vibrio caribbenthicus</i> (α -hemolisina)	30	1,00E-31
ADN74545.1	<i>Ferrimonas balearica</i> (Lipoproteína)	34	3,00E-30
ABO88523.1	<i>Aeromonas salmonicida</i> (Lipoprotein)	32	1,00E-30

Se seleccionaron las proteínas, entregadas por BLASTP con mayor homología a la α -hemolisina de *P. salmonis* y cuyo valor e fuera superior a -30. Al igual que en los casos anteriores, éstas fueron utilizadas en un alineamiento múltiple de secuencias junto a la α -hemolisina de *P. salmonis* para la determinación del grado de conservación entre éstas (Figura 13).

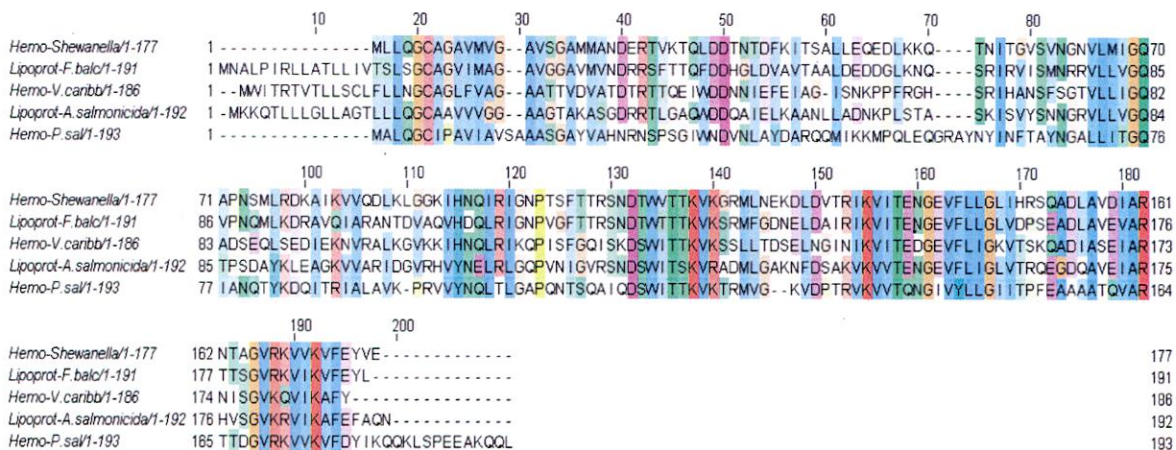


Figura 13: Alineamiento múltiple de secuencias entre la proteína α -hemolisina de *P. salmonis* predicha por RAST y FgenesB y las proteínas de mayor similitud encontrados por el análisis con BLASTP (Tabla 11). Alineamiento realizado por ClustalW y procesado por Jalview, los colores muestran el grado de conservación.

Se analizaron los contigs que contenían los genes de las proteínas TolC, HlyB y α -hemolisina, pero la secuencia del gen *hlyB*, que codifica para el transportador ABC o ATPasa (HlyB) del SSTI no fue encontrado. Posteriormente, se analizaron contigs de tamaño pequeño por BLASTX y FgenesB (inferiores a 600 pb), los que no habían sido reconocidos por el servidor RAST, pero tampoco se encontró algún homólogo a dicho gen, concluyendo que en estos contigs obtenidos hasta el momento de la secuenciación parcial del genoma de *P. salmonis*, no está presente el gen *hlyB*.

Por consiguiente, a modo de resumen, como se observa en la Figura 14, se encontraron tres genes relacionados con el SSTI en el genoma de *P. salmonis*. Dos genes de ellos estructurales, *hlyD* (proteína de fusión de membrana) y *TolC* (proteína de membrana externa). El tercer gen corresponde al de una proteína efectora (α -hemolisina), la que es secretada por este sistema.

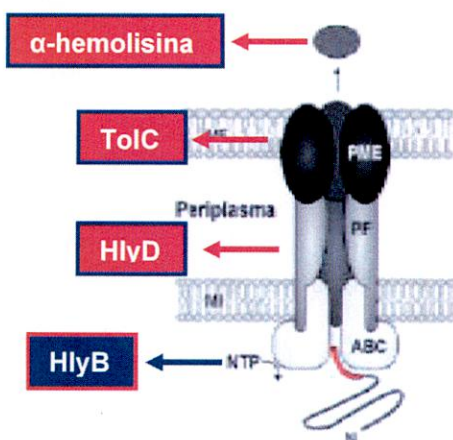


Figura 14: Esquema general de la estructura del SSTI. Resaltados en rojo (flecha y cuadros) están indicadas las proteínas codificadas por los genes encontrados en el genoma de *P. salmonis*. En azul se muestra la proteína HlyB (ATPasa), que hasta el momento no se ha detectado en el genoma de *P. salmonis*.

7.2.2 Genes del Sistema de Secreción Tipo II (SSTII)/Pili Tipo IV

Respecto a los genes del SSTII, se diseñaron cebadores degenerados para la amplificación de dos de sus genes estructurales. Uno de ellos fue para *pulE*, que codifica para la ATPasa, y el otro *pulD*, que corresponde al gen que codifica para la proteína estructural del pili de secreción.

En el caso del gen *pulE*, se obtuvo un producto amplificado de aproximadamente 400 pb (Figura 15), que fue clonado en el vector PCR2.1 TOPO TA y enviado a secuenciación.



Figura 15: PCR de la amplificación del gen *pulE* del SSTII con cebadores degenerados. Gel agarosa al 1%. **MK:** Marcador de ADN de 100 pb. **C-:** Blanco o control negativo de PCR. 1 y 2: ADN de *P. salmonis* amplificado a diferentes temperaturas de "annealing".

El análisis de la secuenciación del producto amplificado y clonado fue finalmente calculado en un tamaño de 440 pb. En una primera instancia el programa BLASTX, arrojó como resultado que la proteína putativa codificada en esa secuencia contenía un dominio conservado con las proteínas de la familia PulE (SSTII), pero también contiene un dominio conservado con la ATPasa (PilB) del Pili Tipo IV. EL Pili Tipo IV es una estructura filamentosa de adhesión presente en muchas bacterias patógenas y que también participa en la movilidad independiente de flagelo que se da sobre superficies sólidas y cuyos genes estructurales comparten alta homología con los genes del SSTII (Flores-Herrera, 2003). Al analizar los resultados de similitudes de secuencias entregados por BLASTX se comprobó que la secuencia comparte una alta homología con proteínas de la familia PilB, a pesar que los valores "e" obtenidos de los análisis fueron relativamente altos (Tabla 13).

Tabla 13: Mayores homologías encontradas por el análisis con BLASTX a la secuencia amplificada con cebadores degenerados dirigidos al gen *pulE* (SSTII). Los mayores porcentajes de similitud corresponden a la proteína PilB (Pili Tipo IV).

GenBank N°	Organismo/Proteína	% Identidad	Valor "e"
ACE83223.1	<i>Cellvibrio japonicus</i> Ueda107 (PilB)	30	3,00E-17
ACV26126.1	<i>Kangiella koreensis</i> DSM 16069 (PilB)	27	2,00E-16
BAC95543.1	<i>Vibrio vulnificus</i> (PilB)	28	5,00E-15
AAN53499.1	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 (PIIB)	29	1,00E-15

Una vez seleccionadas las 4 secuencias con mayor grado de similitud, éstas fueron utilizadas para realizar un alineamiento múltiple de secuencias con el producto de los cebadores para *pulE* de *P. salmonis*, con la finalidad de visualizar el grado de conservación entre las secuencias (Figura 16). Se puede observar que el grado de conservación no es muy alto y además la secuencia de *P. salmonis* contiene un gap de al menos 15 aminoácidos con respecto a las otras secuencias analizadas.



Figura 16: Alineamiento múltiple de secuencias entre la secuencia de proteína putativa PilB de *P. salmonis* predicha por BLASTX y las proteínas de mayor similitud encontrados en el análisis realizado con el mismo programa (Tabla 13). Alineamiento realizado por ClustalW y procesado por Jalview, la intensidad de los colores indican el grado de conservación entre los aminoácidos.

Respecto a la amplificación del gen *pulD*, no se obtuvo producto de amplificación con los set de cebadores degenerados diseñados. Por tal motivo, se efectuó una búsqueda de genes del SSTII en los resultados obtenidos del análisis con RAST del genoma de *P. salmonis*.

En diferentes contigs se encontraron dos genes estructurales del Pili Tipo IV, que tiene un alto grado de conservación con el SSTII. En el contig0879 RAST hizo la predicción de varios genes metabólicos y al final de la secuencia se detectó la presencia del gen *pilQ* truncado (proteína de membrana externa) debido lo fragmentado de la la secuenciación del genoma. Los resultados por FgenesB, generó los mismos ORF putativos en la secuencia, se seleccionó el ORF final, se analizó por BLASTX y la secuencia aminoacídica predicha fue evaluada por BLASTP. La secuencia tiene un alto grado de similitud con el gen *pilQ*, tal como había sido predicho por RAST (tabla 14), además de presentar dominios conservados con proteínas de la misma familia, entre las que se encuentran las secretinas. Las 4 secuencias con mayor grado de homología fueron seleccionadas para realizar un alineamiento múltiple de secuencias con la proteína putativa PilQ de *P. salmonis*, los resultados fueron procesados con Jalview (Figura 17).

Tabla 14: Mayores homologías encontradas por el análisis con BLASTX y BLASTP a la secuencia *pilQ* (Pili Tipo IV) predicha pos RAST y FgenesB.

GenBank N°	Organismo/Proteína	% Identidad	Valor "e"
ADE16899.1	<i>Nitrosococcus halophilus</i> Nc4 (PilQ)	46	4E-108
ABE53556.1	<i>Shewanella denitrificans</i> OS217 (pilQ)	44	4E-100
AAZ25362.1	<i>Colwellia psychrerythraea</i> (PilQ)	43	1E-99
ABQ56281.1	<i>Legionella pneumophila</i> cepa Corby (PilQ)	43	3E-97



Figura 17: Alineamiento múltiple de secuencias entre la secuencia de proteína putativa PilQ de *P. salmonis* predicha por RAST y FgenesB y las proteínas de mayor similitud encontradas en el análisis con BLASTX y BLASTP (Tabla 14). Alineamiento realizado por ClustalW y procesado por Jalview, la intensidad de los colores indican el grado de conservación de los aminoácidos.

Al continuar la búsqueda se encontró que en el contig00029, RAST realizó la predicción de un ORF que tenía alto grado de similitud con el gen *fimT*, que codifica para una proteína de anclaje del Pili Tipo IV. El contig fue analizado por FgenesB, para luego corroborar los resultados de RAST con BLASTP, encontrando que la proteína putativa codificada en el ORF tiene cierto grado de similitud con la proteína FimT (Tabla 15), además de contener un dominio conservado que está presente en proteínas de la familia GspH del SSTII, al cual pertenece FimT.

Tabla 15: Mayores homologías encontradas por el análisis con BLASTP a la proteína putativa FimT (Pili Tipo IV) predicha por RAST y FgenesB.

GenBank N°	Organismo/Proteína	% Identidad	Valor "e"
AEP31126.1	<i>Glaciecola nitratireducens</i> FR1064 (FimT)	29	8E-32
EHY76878.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (FimT)	29	1E-31
ABZ75711.1	<i>Shewanella halifaxensis</i> (FimT)	31	2E-31
EGM18316.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (FimT)	33	4E-31

Las 4 secuencias con mayor grado de similitud a la proteína putativa FimT de *P. salmonis* fueron utilizadas para realizar un alineamiento múltiple de secuencias, con la finalidad de determinar el grado de conservación entre éstas (Figura 18). Se observó que en el extremo amino de la proteína el grado de conservación es mayor, ya sea por la presencia de aminoácidos idénticos u homólogos (misma carga, por tanto, no altera la función del sitio activo).



Figura 18: Alineamiento múltiple de secuencias entre la secuencia de proteína putativa FimT de *P. salmonis* predicha por RAST y FgenesB y las proteínas de mayor similitud encontradas en el análisis con BLASTP (Tabla 15). Alineamiento realizado por ClustalW y procesado por Jalview, la intensidad de los colores muestran el grado de conservación de los aminoácidos.

En resumen, como se observa en la figura 19 se ha detectado en el genoma de *P. salmonis* la presencia de genes estructurales del Pili Tipo IV, el cual comparte homología estructural y de secuencia de sus partes con el SSTII, pero no se encontraron secuencias relacionadas con el SSTII.

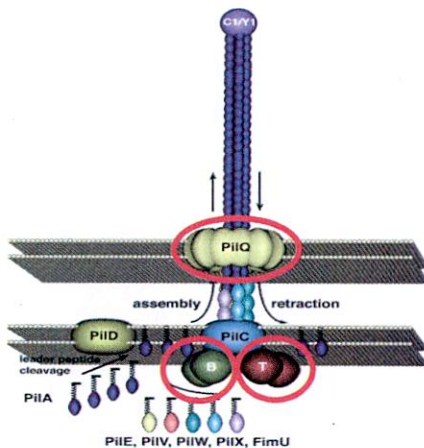


Figura 19: Esquema general de la estructura del Pili Tipo IV. Resaltados en círculo rojo están indicadas las proteínas codificadas por los genes encontrados en el genoma de *P. salmonis* (PilB, FimT y PilQ). Cabe mencionar que las proteínas externas del pili son exportadas al periplasma por la maquinaria Sec, para que el resto de las proteínas del pili funcionen como un SSTII.

7.2.3 Genes del Sistema de Secreción Tipo III (SSTIII)/Genes Flagelares

Para la obtención de genes relacionados con el SSTIII en el genoma de *P. salmonis*, se utilizaron 3 estrategias diferentes. La primera y la segunda, al igual que para los demás sistemas de secreción, fueron basadas en el diseño de cebadores degenerados para PCR y secuenciación parcial del genoma de la bacteria. La tercera fue la búsqueda de los genes del SSTIII en el plásmido críptico de *P. salmonis*, realizando la secuenciación de éste. Los resultados obtenidos con las tres estrategias utilizadas se detallan a continuación.

A) Cebadores degenerados/secuenciación del genoma de *P. salmonis*

Se diseñaron cebadores degenerados dirigidos a amplificar el gen de la ATPasa LcrD, el monómero de la aguja de secreción MixA y los efectores IpaB, IpaC e IpaD.

Utilizando los cebadores dirigidos a amplificar el gen de la ATPasa del sistema, se obtuvo un producto amplificado cercano a los 200 pb (Figura 20), sin existir amplificaciones inespecíficas.

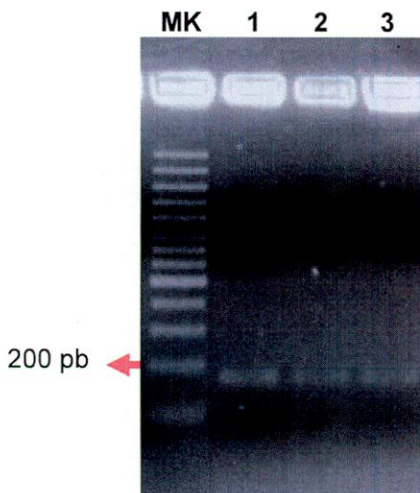


Figura 20: Gradiente de PCR para la amplificación del gen *lcrD* (ATPasa) del SSTIII con cebadores degenerados. Gel agarosa al 1%. **MK:** Marcador de ADN de 100 pb. **1-3:** ADN de *P. salmonis* amplificado (150 pb aproximadamente).

La secuencia amplificada de aproximadamente 200 pb, fue clonada en el vector pCR2.1 TOPO TA y enviada a secuenciación. Los resultados de la secuenciación fueron analizados por BLASTN (nucleótidos) y BLASTX, obteniéndose que el producto amplificado comparte alta homología con el gen *flhA*, que codifica a una proteína implicada en la biosíntesis del flagelo (Tabla 16).

Tabla 16: Mayores homologías encontradas por BLASTN al producto obtenido de la amplificación con cebadores dirigidos a amplificar el gen *lcrD* del SSTIII.

GenBank N°	Organismo/Gen	% Identidad	Valor "e"
CP000469.1	<i>Shewanella sp. (flhA)</i>	74	5E-32
CP002771.1	<i>Marinomonas posidonica (flhA)</i>	73	2E-29
CP003069.1	<i>Vibrio cholerae O1 (flhA)</i>	73	2E-21
CR378665.1	<i>Photobacterium profundum SS9 (flhA)</i>	72	6E-22

Las secuencias nucleotídicas con mayor grado de similitud al gen putativo *flhA* de *P. salmonis* obtenidas por BLASTN fueron seleccionadas para realizar un alineamiento múltiple de secuencias con ClustalW (Figura 21-A). Del análisis con BLASTX se obtuvo que la región amplificada está contenida en la región inicial de *flhA*, específicamente entre los primeros 150 aminoácidos de la proteína. Las secuencias aminoacídicas obtenidas por el análisis fueron también seleccionadas para un alineamiento múltiple con ClustalW (Figura 21-B).



Figura 21: Alineamiento múltiple de secuencias entre la secuencia FlhA de *P. salmonis*, amplificada con los cebadores degenerados para *lcrD* y las secuencias de mayor similitud encontradas en el análisis con BLASTN (Tabla 16) y BLASTX. Alineamiento realizado por ClustalW y procesado por Jalview. **A:** Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los resultados obtenidos por BLASTN. Verde: T, Café: G, Celeste: A y Rosado: C. **B:** Alineamiento de las secuencias aminoacídicas predichas por BLASTX, la intensidad de los colores indican el grado de conservación de los aminoácidos entre las diferentes secuencias.

Estos resultados indican que la secuencia amplificada no corresponde a un gen del SSTIII, sino que a un gen implicado en la biosíntesis flagelar, *flhA*, que se encuentra altamente conservado entre los diferentes organismos que fueron comparados. En todos los análisis realizados la mayor homología de la secuencia de *P. salmonis* fue con *flhA*, sin encontrar similitud con *IcrD* (ATPasa SSTIII).

En las amplificaciones realizadas con los cebadores degenerados diseñados contra los genes *mixA*, *ipaB*, *ipaC* e *ipaD* del SSTIII no se obtuvieron productos amplificados, por lo que continuó la búsqueda de genes de este sistema en los resultados de la secuenciación parcial del genoma de *P. salmonis*. Al realizar este análisis no se encontró la presencia de genes homólogos al SSTIII, pero si se corroboró el hallazgo anterior, ya que RAST hizo la predicción de genes flagelares en diferentes contigs, incluido al gen *flhA*. Los resultados fueron analizados por FgenesB para corroborar los ORFs encontrados. Las proteínas putativas predichas por FgenesB fueron analizadas por BLASTP, demostrando que éstas tienen un alto grado de similitud con genes flagelares. Posteriormente, los contigs que contenían los genes flagelares fueron procesados con el software CLC-Workbench, que realizó un nuevo análisis de ORFs, arrojando la misma predicción antes obtenida con RAST y FgenesB (Softberry). Los resultados fueron procesados y esquematizados con CLC-Workbench para ilustrar la organización de los operones flagelares de *P. salmonis*.

El contig00127 es de 3700 pb de longitud y de acuerdo a los análisis contiene dos ORFs putativos. El primero corresponde al gen *flhA* (componente de la maquinaria de exportación flagelar). El segundo ORF corresponde a *flhF*, gen implicado en la regulación de los genes tipo III de la cascada de expresión de genes flagelares (Figura 22).

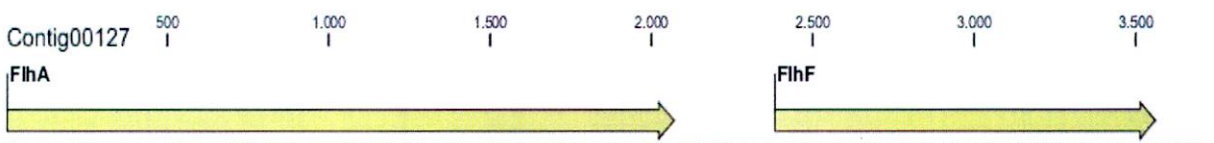


Figura 22: Esquema de la organización del contig00127 que contiene a los genes *flhA* (2030 pb) y *flhF* (1100 pb), ambos codificantes de proteínas reguladoras para la expresión de otros genes de la cascada de genes flagelares. Las flechas indican la orientación de los genes dentro del contig. Los números indican a los nucleótidos en el contig. Figura procesada con CLC-Workbench.

Por otro lado, el contig00060 (6146 pb) contiene 7 ORFs putativos, que corresponden a los genes flagelares: *fliJ*, *fliI* (ATPasa), *fliH* (proteína de ensamblaje H), *fliG* (proteína motora G) y *fliF* (Proteína del anillo M), se encuentran formando un operón, al igual que en otros organismos como *V. cholerae*. Cabe mencionar que los ORFs de los genes putativos *fliH* y *fliF* aparecen divididos en dos, debido que en la secuencia aparece un codón de término (TAA) que los trunca, probablemente a un error en la secuenciación, puesto que cuando termina una parte de cada gen, continúa inmediatamente la otra sin haber espacio intergénico o inserción (Figura 23).

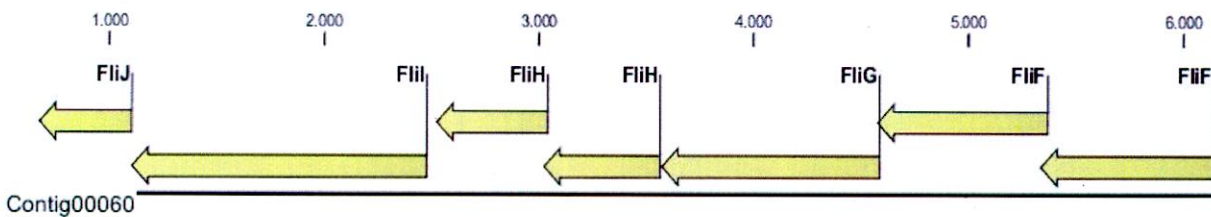


Figura 23: Esquema de la organización del contig00060 que contiene a los genes *fliJ*, *fliI*, *fliH*, *fliG* y *fliF*, que codifican para proteínas estructurales del sistema flagelar. Las flechas indican la orientación de los genes dentro del contig (orientación negativa). Los números indican a los nucleótidos en el contig. La figura fue procesada con CLC-Workbench.

Al continuar el análisis de los contigs obtenidos por la secuenciación parcial del genoma de *P. salmonis*, se encontró que en el contig00009 (11234 pb), RAST realizó la predicción de 11 ORFs que codifican para diferentes proteínas relacionadas con el aparato estructural del sistema flagelar, específicamente las proteínas FlgB-K. El contig fue nuevamente analizado por FgenesB y CLC-Workbench, obteniendo los mismos ORFs antes predichos. Al hacer un análisis en BLASTP de las proteínas putativas codificadas por los ORFs seleccionados por FgenesB y CLC-Workbench, se obtuvo el mismo resultado anterior predicho por RAST, que el contig contiene 11 ORFs que corresponderían a los genes *flgB*, *flgC*, *flgD*, *flgE*, *flgF*, *flgG*, *flgH*, *flgI*, *flgJ* y *flgK* (Figura 24). El gen *flgI* está truncado por un codón de término, similar a *fliH* y *fliF* (Figura 23), haciendo suponer que corresponde a un error en la secuenciación.

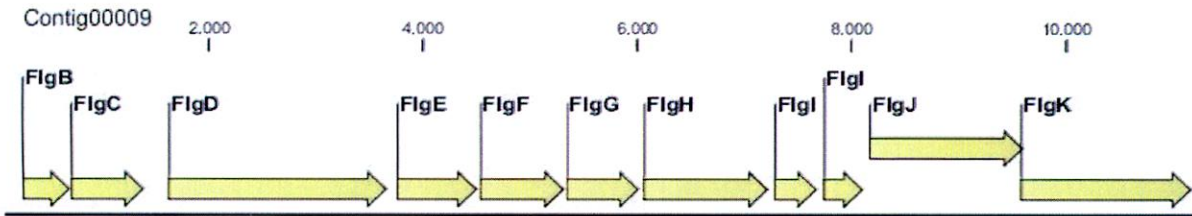


Figura 24: Esquema de la organización del contig00009 que contiene a los genes *flgB-K*, que codifican para proteínas estructurales del sistema flagelar. Las flechas indican la orientación de los genes dentro del contig. La organización es similar a otros organismos como *V. cholerae*. Los números indican a los nucleótidos en el contig. La figura fue procesada con CLC-Workbench.

El contig00387, al ser analizado por RAST, FgenesB y CLC-workbench mostró contener dos ORFs putativos, que corresponden a los genes *fleN* (regulador de la síntesis flagelar) y *fliA* (factor Sigma-28) (Figura 25). Estos genes son importantes en la regulación de la expresión de la maquinaria flagelar y están al inicio de la cascada de expresión. Adicionalmente, se puede ver que estos genes en *P. salmonis* están sobrelapados, en donde los últimos 4 nucleótidos de *fleN* son los iniciales de *fliA*.

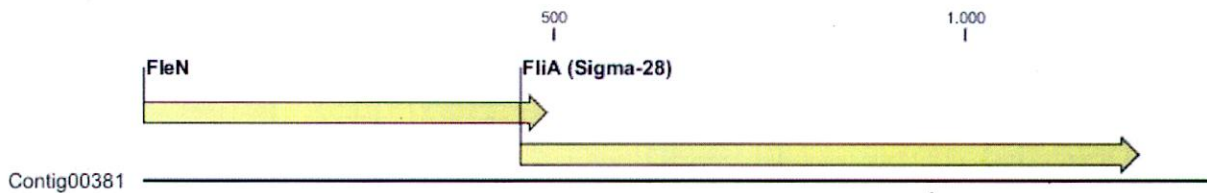


Figura 25: Esquema de la organización del contig00381, que contiene a los genes reguladores de la expresión de la maquinaria flagelar *fleN* y *fliA*. Las flechas indican la orientación de los genes dentro del contig. Se observa un sobrelapamiento de los genes. Los números indican a los nucleótidos en el contig. La figura fue procesada con CLC-Workbench.

Finalmente, el análisis entregado por RAST de las secuencias del genoma de *P. salmonis* permitió dilucidar otro par de genes flagelares, *motA* y *motB*, que codifican para las proteínas motoras de rotación flagelar MotA y MotB, respectivamente. El contig00095 que las contiene también tiene otras enzimas no relacionadas con la biosíntesis flagelar y una proteína hipotética, sin dominios conservados encontrados (Figura 26). Los resultados obtenidos por RAST fueron también comprobados con FgenesB/BLASTP y CLC-Workbench.

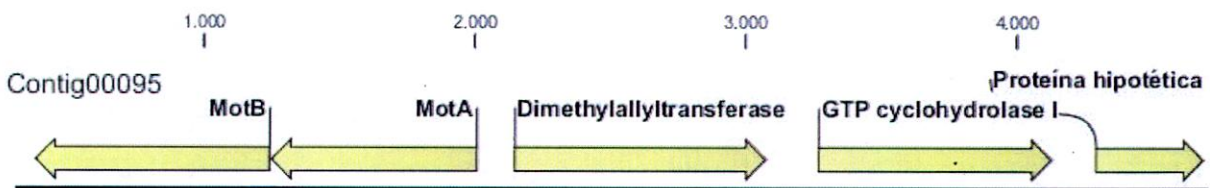


Figura 26: Esquema de la organización del contig00095 que presenta los genes de las proteínas motoras de rotación flagelar MotA y MotB. Las flechas indican la orientación de los genes dentro del contig. Los números indican a los nucleótidos en el contig. La figura fue procesada con CLC-Workbench.

Los resultados demuestran que el genoma de *P. salmonis* contiene casi por completo los genes del sistema flagelar. Los análisis realizados, no permitieron obtener como resultado a genes relacionados con el SSTIII, por lo tanto, se inició la búsqueda de éstos en el plásmido críptico de la bacteria.

B) Búsqueda de genes del SSTIII en el plásmido de *P. salmonis*

Debido a que no encontraron genes del SSTIII en el cromosoma de la bacteria, se realizó una búsqueda de éstos en el plásmido, ya que se ha descrito que este sistema puede estar codificado en el cromosoma o bien en plásmidos de virulencia.

Para ello, el plásmido fue purificado desde la bacteria utilizando un kit de midiprep, con la finalidad de obtener una concentración elevada de éste. Los resultados fueron visualizados en geles de agarosa al 1% (Figura 27).

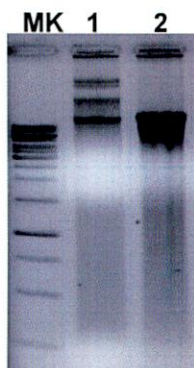


Figura 27: Purificación del plásmido de *P. salmonis*. Gel agarosa al 1% **MK:** Marcador de ADN de 1 Kb. **1:** Plásmido *P. salmonis* (pP.sal). **2:** ADN cromosomal de *P. salmonis*.

Una vez obtenido el ADN plasmidial de *P. salmonis*, éste fue sometido a una purificación por una gradiente discontinua de CsCl/Bromuro de Etidio, con la finalidad de eliminar toda contaminación posible con ADN cromosomal (Figura 28).

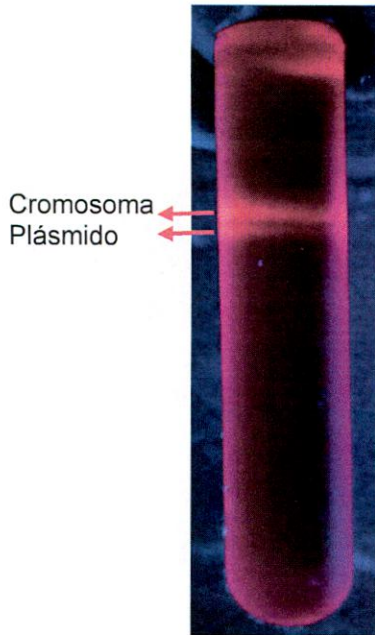


Figura 28: Gradiente discontinua de CsCl/Bromuro de Etidio visualizada bajo luz UV.

Se puede observar claramente la separación entre el cromosoma (banda superior) y el plásmido de *P. salmonis* (banda inferior).

Los resultados de la secuenciación parcial del plásmido de *P. salmonis* fueron analizados en primera instancia en el servidor Softberry, con el algoritmo FgenesB. Posteriormente, las secuencias aminoacídicas predichas por FgenesB fueron sometidas a un análisis con BLASTP con la finalidad de determinar las identidades de éstas. De los resultados obtenidos se pudo concluir que al menos en los contigs obtenidos no hay genes que tengan relación con el SSTIII, como tampoco con otros posibles mecanismos de virulencia. Para comprobar los resultados, las secuencias fueron analizadas en el servidor RAST, obteniendo los mismos resultados anteriores, lo que indicaría que *P. salmonis* no contiene el SSTIII, por lo que otro sistema estaría siendo el responsable de la virulencia en la bacteria.

7.2.4 Genes del Sistema de Secreción Tipo IV (SSTIV)

Existen 3 tipos de SSTIV, de los cuales, SSTIV-A y IV-B están implicados directamente en la virulencia, ya que facilitan la secreción de moléculas efectoras.

A) SSTIV-A (VirB/D4 homólogo)

Para el SSTIV-A se diseñaron cebadores degenerados que permitieran la amplificación de los genes *virB11* (ATPasa), *virD4* (ATPasa), *virB2* (monómero del pili de secreción) y *virB5*. Al utilizar los cebadores diseñados para PCR no se obtuvo amplificación para ninguno de ellos, por ese motivo nuevos sets de cebadores fueron diseñados, pero los resultados fueron de igual forma infructuosos (Figura 29).

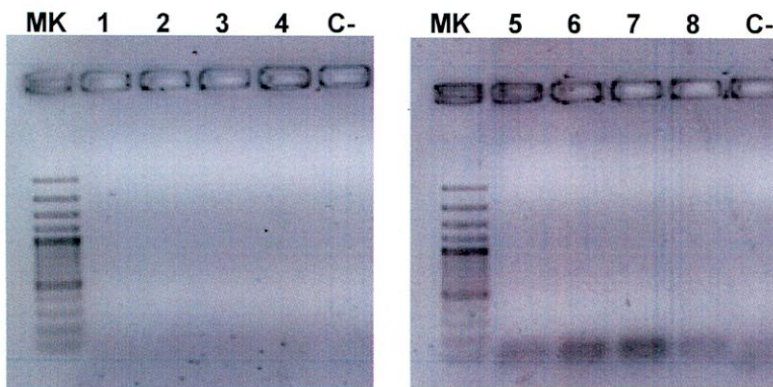


Figura 29: Amplificación de los genes del *virB11*, *virD4* y *virB2* del SSTIV-A. Gel agarosa 1%. **MK:** marcador ADN 100 pb. **1-2:** *virB11*; **3-4:** *virD4* **5-6:** *virB2*; **7-8:** *virB5*; **C-:** Blanco

Como en todos los casos anteriores, los genes fueron buscados en las secuencias del genoma de *P. salmonis* analizadas por el servidor RAST. No se encontraron secuencias relacionadas con el SSTIV-A en el genoma de la bacteria, por lo cual, se podría señalar que no hay un homólogo al sistema VirB/D en el genoma de *P. salmonis*.

B) SSTIV-B (Dot/lcm homólogo)

Para el sistema Dot/lcm, igualmente se diseñaron cebadores degenerados dirigidos a amplificar los genes *dotB* (ATPasa), *icmK* (proteína de membrana externa), *lcmF* (proteína transmembrana) e *icmS* (proteína citoplasmática).

Para los genes *dotB* e *icmK* se obtuvo un amplicón de 300 pb y 200 pb, respectivamente (Figura 30). Estos amplicones fueron clonados en el vector pCR2.1 TOPO TA y enviados a secuenciación.

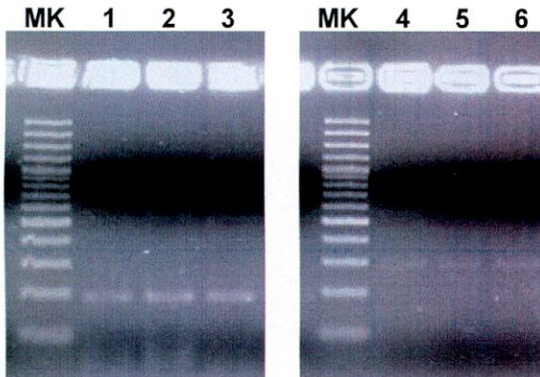


Figura 30: Amplificación de los genes *icmK* y *dotB* del SSTIV-B con cebadores degenerados. Gel agarosa al 1%. **MK:** Marcador de ADN de 100 pb. **1-3:** *icmK* (200 pb). **4-6:** *dotB* (300).

Con respecto a los genes *icmS* e *icmF* se obtuvieron amplificaciones inespecíficas, tanto al utilizar una gradiente de temperatura para PCR, como al usar diferentes sets de cebadores (Figura 31), pero de igual forma, las secuencias fueron clonadas y enviadas a secuenciación.

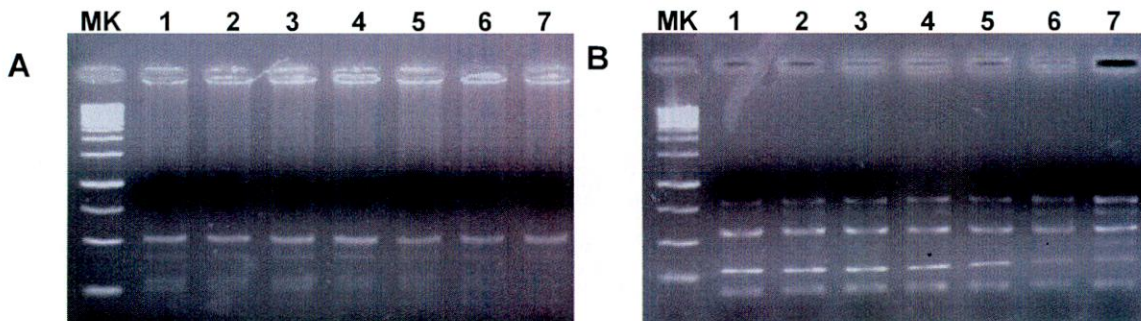


Figura 31: Amplificación inespecífica de los genes *icmS* (panel A) e *icmF* (panel B). Gel agarosa al 1%. **MK:** Marcador de ADN de 100 pb. **1-7:** ADN de *P. salmonis* en gradiente de temperatura (56-62°C).

Las secuencias obtenidas fueron analizadas por BLASTN y BLASTX. El análisis del producto amplificado para *dotB* por BLASTN, demostró tener alto grado de homología con el gen *dotB* (Dot/Icm) de otros organismos filogenéticamente cercanos a *P. salmonis*. Además, el análisis realizado por BLASTX demostró que la proteína putativa codificada por la secuencia amplificada tiene alto grado de similitud con la proteína DotB (Tabla 17).

Tabla 17: Mayores homologías encontradas por BLASTX para el gen *dotB* del SSTIV-B.

GenBank N°	Organismo/Proteína	% Identidad	Valor "e"
EDP46591.1	<i>Rickettsiella grylli</i> (DotB)	69	2E-40
CBJ10695.1	<i>Legionella longbeachae</i> NSW150 (DotB)	69	5E-39
CP000890.1	<i>Coxiella burnetii</i> RSA (DotB)	68	5E-38
AE017354.1	<i>Legionella pneumophila</i> (DotB)	68	3E-38

Las cuatro secuencias con mayor grado de identidad con esta nueva proteína putativa DotB de *P. salmonis* fueron sometidas a un alineamiento múltiple de secuencias con ClustalW, con la finalidad de determinar el grado de conservación (Figura 32).

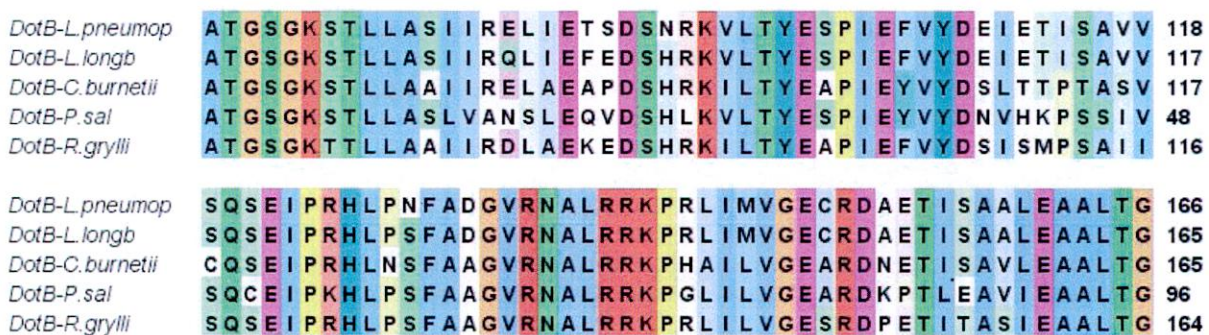


Figura 32: Alineamiento múltiple de secuencias entre la nueva proteína putativa DotB de *P. salmonis* y las proteínas con mayor porcentaje de similitud encontradas en el análisis con BLASTX (Tabla 17). Alineamiento realizado por ClustalW y procesado por Jalview.

Para *icmK*, el resultado BLASTN mostró que la secuencia comparte alto grado de similitud con el gen de la proteína *IcmK* del sistema Dot/Icm. El análisis con BLASTX también arrojó que la proteína putativa codificada en la secuencia amplificada comparte similitudes con *IcmK* (Tabla 18), lo que indica la presencia de este gen en el genoma de *P. salmonis*.

Tabla 18: Mayores homologías encontradas por BLASTX al producto obtenido de la amplificación con cebadores dirigidos al gen *icmK* del SSTIV-B.

GenBank N°	Organismo/Proteína	% Identidad	Valor "e"
EHL29524.1	<i>Legionella drancourtii</i> LLAP12 (<i>IcmK</i>)	49	1E-30
AAS91991.1	<i>Legionella pneumophila</i> (<i>IcmK</i>)	49	3E-30
EDR35502.1	<i>Coxiella burnetii</i> RSA (<i>IcmK</i>)	46	5E-29
EDP46565.1	<i>Rickettsiella grylli</i> (<i>IcmK</i>)	41	3E-28

Las 4 secuencias con mayor porcentaje de similitud fueron utilizadas para un alineamiento múltiple de secuencias con ClustalW (Figura 33), mostrando un alto grado de conservación entre la secuencia de *P. salmonis* y las otras proteínas lcmK.

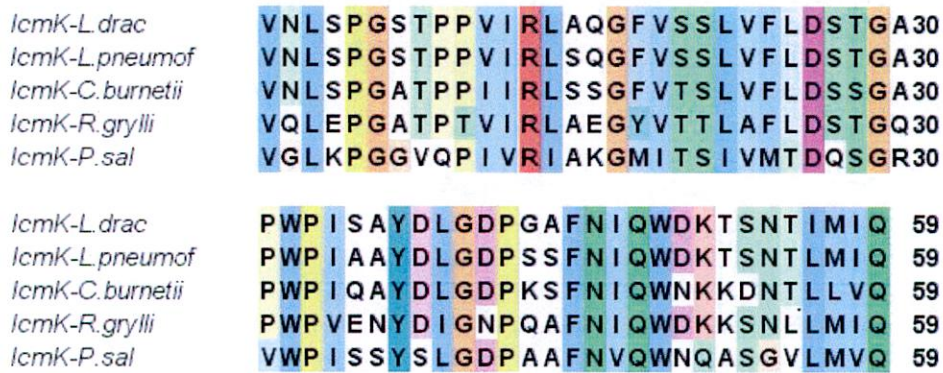


Figura 33: Alineamiento múltiple de secuencias entre la proteína putativa lcmK de *P. salmonis* y las proteínas con mayor porcentaje de similitud encontradas en el análisis con BLASTX (Tabla 18). Alineamiento realizado por ClustalW y procesado por Jalview.

Las amplificaciones con los cebadores degenerados dirigidos hacia *icmS* e *icmF*, no tuvieron éxito, ya que los productos amplificados una vez secuenciados, no tenían relación con genes *dot/icm*.

Previo a la obtención de la secuenciación parcial del genoma de *P. salmonis* y con la finalidad de obtener otros genes relacionados con el aparato de secreción del sistema Dot/Icm se realizó un LR-PCR, utilizando una combinación de cebadores dirigidos a *dotB*, *ChaP.s* e ITS (ver detalles en materiales y métodos). Se logró amplificar un producto cercano a los 10 kb con los cebadores *dotB*/ITS (Figura 34-A). El producto fue digerido parcialmente con la enzima Sau3AI y los fragmentos resultantes fueron subclonados en el vector pBluescript SK+ para su secuenciación (Figura 34-B).

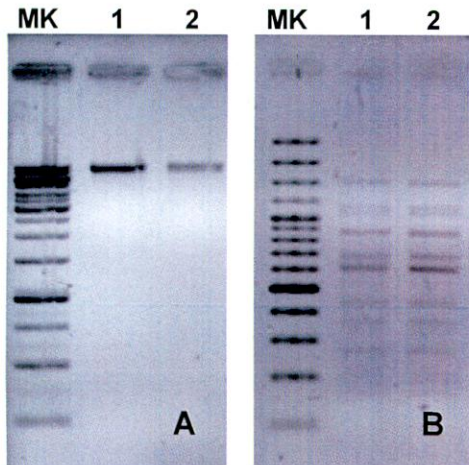


Figura 34: LR-PCR con cebadores *dotB*/ITS. Gel agarosa al 1%. **MK:** Marcador ADN 1 Kb. **Panel A:** 1-2:LR-PCR de *P. salmonis*. **Panel B:** 1-2: Digestión con *Sau3AI*.

Posterior a la secuenciación de los clones y análisis por BLASTX se obtuvo un fragmento de 410 pb que codifica para una proteína con alto grado de similitud con la proteína *lcmE* del sistema *Dot/lcm* (Tabla 18).

Tabla 19: Mayores homologías encontradas por BLASTX al fragmento *Sau3AI* derivado del LR-PCR (*dotB*/ITS). Las mayores similitudes fueron encontradas con la proteína *lcmE* del sistema *Dot/lcm*.

GenBank N°	Organismo/Proteína	% Identidad	Valor "e"
CAA75165.1	<i>Legionella pneumophila</i> (<i>lcmE</i>)	45	5E-33
CBJ13218.1	<i>Legionella longbeachae</i> D-4968 (<i>lcmE</i>)	45	6E-32
EDP45922.1	<i>Rickettsiella grylli</i> (<i>lcmE</i>)	41	2E-30
EDR35505.1	<i>Coxiella burnetii</i> RSA (<i>lcmE</i>)	36	1E-30

Una vez obtenida la identidad de la secuencia proveniente de la digestión *Sau3AI* del LR-PCR, se seleccionaron las 4 secuencias con mayor porcentaje de similitud para la realización del alineamiento múltiple de secuencias con ClustalW (Figura 35). Demostrando que existe un alto grado de conservación entre la proteína putativa *lcmE* de *P. salmonis* con la de otros organismos cercanos filogenéticamente.



Figura 35: Alineamiento múltiple de secuencias entre la proteína putativa *lcmE* de *P. salmonis* y las proteínas con mayor porcentaje de similitud encontradas en el análisis BLASTX (Tabla 19). Alineamiento realizado por ClustalW y procesado por Jalview. La intensidad de los colores indica el grado de conservación de los aminoácidos.

Una vez obtenidos los resultados de la secuenciación parcial del genoma de la bacteria, se realizó la búsqueda de los genes del sistema Dot/Icm en el análisis efectuado por RAST. En el contig00229 (2335 pb) RAST realizó la predicción de un ORF relacionado con el sistema Dot/Icm, específicamente el gen *dotA*, que codifica para la proteína globular de membrana externa DotA. El contig fue sometido al análisis con FgenesB y posteriormente, a BLASTX y BLASP, comprobando que el gen encontrado en ese contig tiene un porcentaje de similitud a *dotA* (Tabla 20).

Tabla 20: Mayores homologías encontradas por BLASTX al gen putativo *dotA* predicho por RAST. Las mayores similitudes fueron con la proteína DotA del sistema Dot/Icm.

GenBank N°	Organismo/Proteína	% Identidad	Valor "e"
EHL29908.1	<i>Legionella drancourtii</i> LLAP12 (DotA)	33	1E-24
ABX79068.1	<i>Coxiella burnetii</i> RSA (DotA)	31	1E-24
AAP75479.1	<i>Legionella pneumophila</i> (DotA)	29	2E-22
EDP46828.1	<i>Rickettsiella grylli</i> (DotA)	27	3E-20

Las secuencias con mayor porcentaje de similitud a DotA de *P. salmonis* fueron utilizadas para un alineamiento múltiple con el programa ClustalW, mostrando que el grado de conservación de ésta, entre los diferentes organismos no es muy alto y además, aparecieron

pneumophila, la que contiene similitud de secuencias con la proteína Trbl codificada en el plásmido RK2 IncP (Figura 37-C).

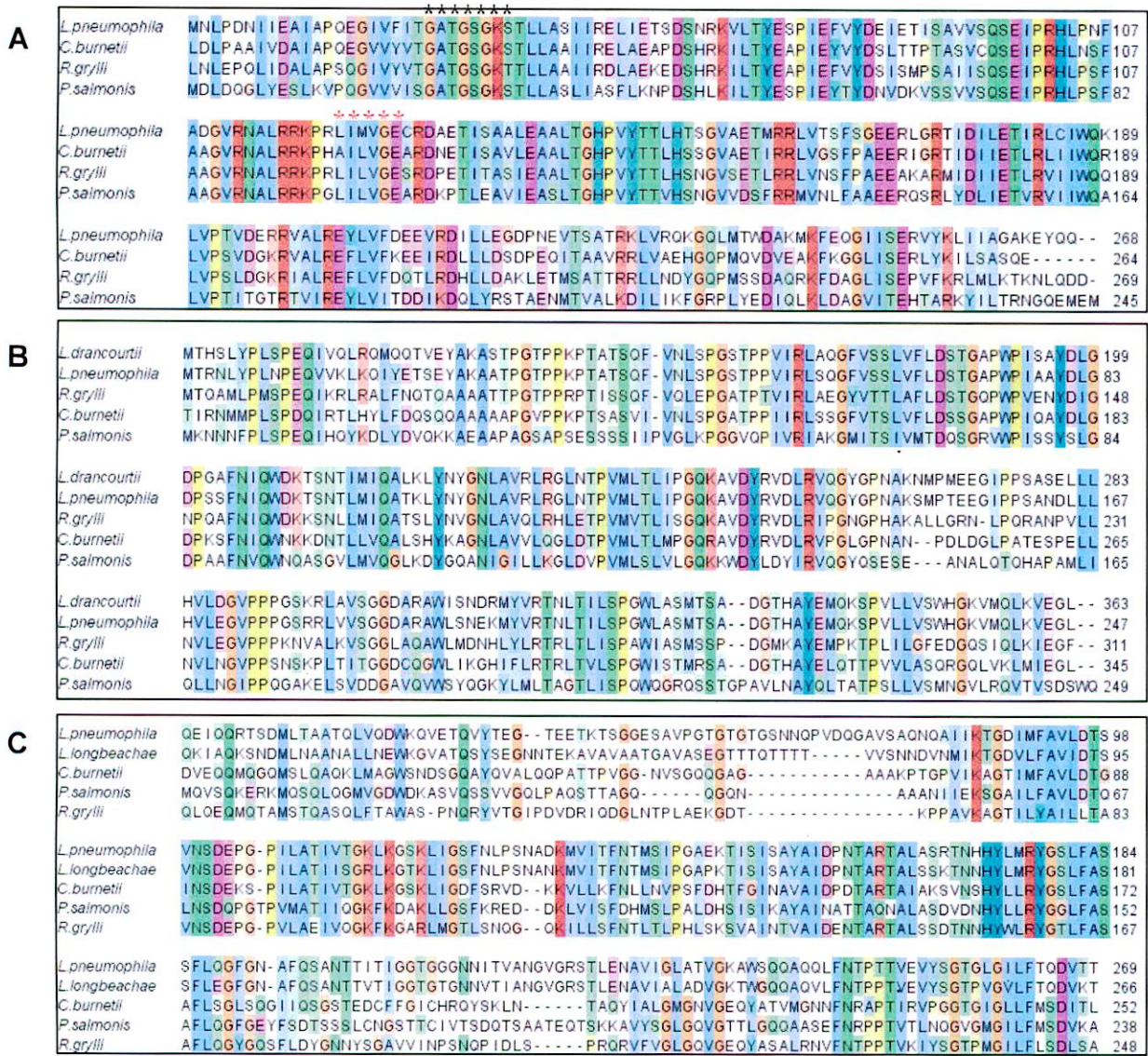


Figura 37: Alineamiento múltiple de secuencias de las proteínas DotB, IcmK e IcmE de *P. salmonis*, obtenidas de la secuenciación del genoma de la bacteria, y las proteínas con mayor porcentaje de similitud encontradas por BLASTP. **A:** alineamiento DotB, donde los asteriscos negros y rojos indican los motivos Walker A y B respectivamente; **B:** alineamiento IcmK; **C:** Alineamiento IcmE. Los alineamientos fueron realizados por ClustalW y procesados con Jalview, la conservación de los aminoácidos está representada por la intensidad de colores.

Los resultados obtenidos, tanto por LR-PCR, como al usar cebadores degenerados y al analizar las secuencias del genoma de *P. salmonis*, indican que la bacteria contiene al menos los genes más relevantes del sistema Dot/Icm.

7.2.5 Genes de los sistemas de secreción Tipo V y VI (SSTV, SSTVI):

Debido a algunos inconvenientes en el diseño de cebadores degenerados para estos dos sistemas, especialmente para el SSTVI, se optó por realizar la búsqueda de estos genes en las secuencias del genoma de *P. salmonis* analizadas por RAST. Al realizar la búsqueda en los diferentes contigs no se hallaron genes que tuvieran relación o similitud con estos dos sistemas de secreción. A pesar de esto, se seleccionaron algunos contigs de tamaño inferior a 600 pb, en los que RAST no había encontrado similitud con algún otro gen en su base de datos o que no había determinado algún ORF en ellos.

Los contigs seleccionados fueron posteriormente analizados por BLASTN y BLASTX, en donde se vio que algunos si contenían ORFs putativos, mostrando una posible secuencia aminoacídica relacionada a ellos, pero no se encontró genes que tuvieran similitud o alguna relación el aparato estructural o efectores secretados por los SSTV y SSTVI. Pudiendo señalar que estos sistemas no están contenidos en el genoma de *P. salmonis*.

En el caso del SSTVII, no se realizó búsqueda de genes homólogos, ya que éste ha sido descrito sólo en organismos Gram-positivos y en bacterias del género *Mycobacterium*.

7.3 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE SECRECIÓN/VIRULENCIA EN *P. SALMONIS*

Con el propósito de determinar si los diferentes genes de secreción y de virulencia encontrados en el genoma de *P. salmonis* se encuentran transcripcionalmente activos, se realizaron ensayos de RT-PCR convencional y de QRT-PCR, demostrando así su estado transcripcional en diferentes condiciones de crecimiento de la bacteria.

7.3.1 EXPRESIÓN DE LOS GENES DEL SSTI

La expresión de los genes *HlyD*, *ToIC* y *hlyA* (α -hemolisina) fue efectuada por RT-PCR convencional, en una cinética de infección en la línea celular RTS11 (24, 48 y 72 horas post-infección). Como control se utilizó ARN extraído de bacterias crecidas en medio líquido, para determinar si la expresión de estos genes es constitutiva.

La Figura 38, muestra la expresión del gen *ToIC* (proteína de membrana externa o porina), observándose un alto nivel de expresión incluso al haber utilizado como templado una dilución del ADNc. Durante la infección en la línea celular se observa un aumento en la intensidad de la banda en el gel a medida que aumenta el tiempo.

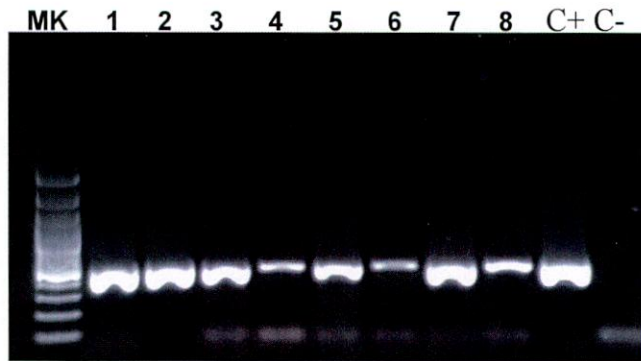


Figura 38: RT-PCR para el gen de la porina *ToIC* del SSTI. Gel agarosa 1%. **MK:** Marcador ADN 100 pb; **1 y 2:** ADNc proveniente de cultivo líquido, No diluido y dilución 1:10, respectivamente; **3 y 4:** ADNc RTS11 infectadas 24 hrs, no diluido y dilución 1:10, respectivamente; **5 y 6:** ADNc RTS11 infectadas 48 hrs, No diluido y dilución 1:10, respectivamente; **7 y 8:** ADNc RTS11 infectadas 72 hrs, no diluido y dilución 1:10, respectivamente; **C+:** Control positivo (ADN *P. salmonis*); **C-:** Control negativo.

Para los genes *hlyD* y *hlyA*, (Figura 39) los resultados fueron semejantes, visualizándose el mismo efecto de aumento en intensidad de la amplificación a medida que avanzaba el tiempo en la cinética de infección. La amplificación de *HlyD* se observa claramente menor que para los otros dos genes.

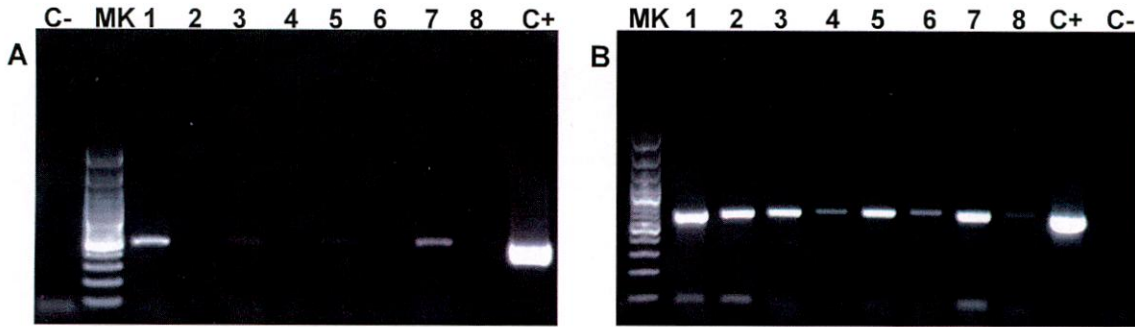


Figura 39: RT-PCR para los genes de las proteínas HlyD y HlyA del SSTI. Gel agarosa 1%.

A: RT-PCR HlyD; **B:** RT-PCR HlyA (α -hemolisina). **MK:** Marcador ADN 100 pb; **1 y 2:** ADNc cultivo líquido, no diluido y dilución 1:10, respectivamente; **3 y 4:** ADNc RTS11 infectadas 24 hrs, no diluido y dilución 1:10, respectivamente; **5 y 6:** ADNc RTS11 infectadas 48 hrs, no diluido y dilución 1:10, respectivamente; **7 y 8:** ADNc RTS11 infectadas 72 hrs, no diluido y dilución 1:10, respectivamente; **C+:** Control positivo PCR (ADN *P. salmonis*); **C-:** Blanco (control negativo PCR).

7.3.2 EXPRESIÓN DEL LOS GENES *DOT/ICM* (SSTIV)

La expresión de los genes del SSTIV fue realizada por QRT-PCR utilizando cuantificación absoluta de la expresión génica. Los genes fueron evaluados en diferentes condiciones de crecimiento de la bacteria.

A) Cinética de infección en las líneas celulares

Se realizó una cinética en las líneas celulares RTS11 y Sf21 a tiempos tempranos de infección (24, 48 y 72 horas), debido a que estos genes deberían comenzar a expresarse al inicio de la infección, como también determinar si es detectable la expresión de éstos. Se utilizó como control de la transcripción bacteriana a la región espaciadora del operón ribosomal (ITS). La Figura 40 muestra los niveles de expresión de los 4 genes del sistema *Dot/Icm* (*dotB*, *lcmE*, *icmK* y *dotA*) en las condiciones antes descritas. Hay una tendencia al aumento de la expresión a medida que aumenta el tiempo en la cinética de infección. Además, se observa que el número de copias del mensaje para los 4 genes es superior en la línea celular Sf21. Adicionalmente, en los 4 genes se observa una clara disminución de su transcripción a las 72 horas post-infección. La mayor expresión de los 4 genes se pudo observar a las 48 horas post-infección en ambas líneas celulares, existiendo casi 1 logaritmo

de diferencia con la cantidad de transcrito observada en los otros tiempos tiempos de la cinética.

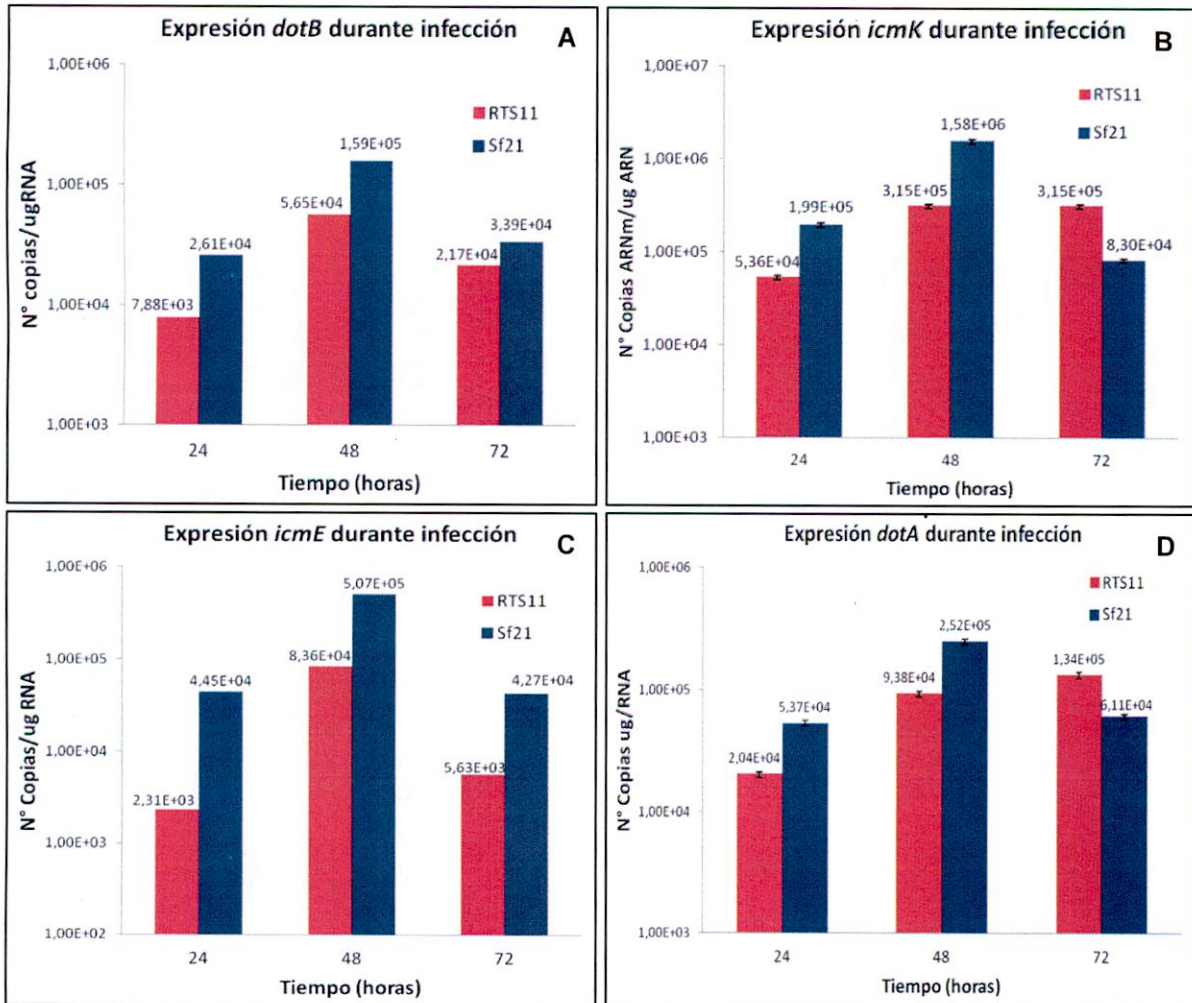


Figura 40: Cuantificación de la expresión (transcripción) de los genes del SSTIV durante una cinética de infección *in vitro* (Dot/lcm). Se observa una tendencia a disminuir la expresión a 72 horas post-infección.

A: Expresión de *dotB*; **B:** expresión de *icmK*; **C:** expresión *IcmE*; **D:** expresión de *dotA*.

Por otro lado, la transcripción del ITS fue aumentando en el tiempo, siendo mucho mayor a las 72 horas horas post-infección. Este hecho se debe a que el número de bacterias va aumentando en el tiempo, ya que se han podido multiplicar en las líneas celulares, indicando

que la infección fue productiva, además demuestra que la transcripción en general no se ha visto alterada durante los tiempos iniciales de la infección (Figura 41).

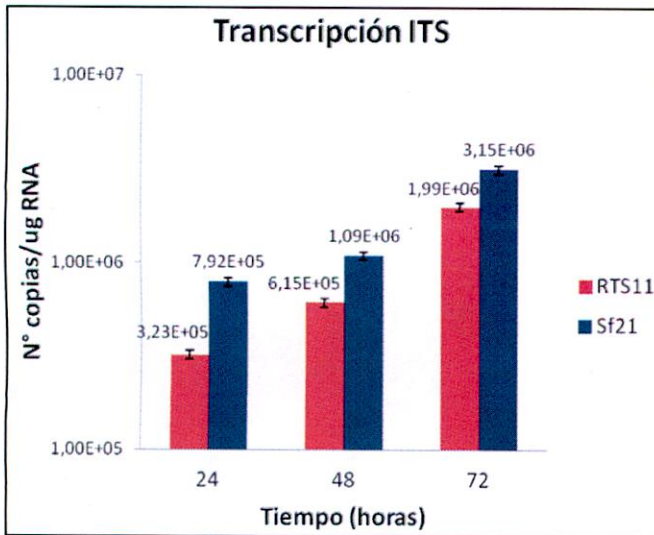


Figura 41: Niveles de transcripción del ITS (operón ribosomal) durante una cinética de infección en las líneas celulares RTS11 y Sf21. Los niveles de transcrito aumentan en el tiempo, indicando que las bacterias están en multiplicación.

B) Expresión de los genes *dot/icm* en medio líquido

Con la finalidad de determinar si los genes *dot/icm* son expresados constitutivamente por *P. salmonis* se realizó la cuantificación de la expresión de éstos durante una cinética de crecimiento en medio MC1 (2, 4, 6, 24 horas) con pH 7,0, temperatura y agitación óptimas para el crecimiento de la bacteria. En paralelo, se evaluó el efecto de dos distintos pHs ácidos (4,0 y 5,0) en la expresión de estos genes, utilizando los mismos tiempos de incubación ya descritos para el pH 7,0. Esta cinética de expresión en pH ácido podría simular el efecto que ocurre durante la fusión fagosoma-lisosoma en los macrófagos en la infección *in vivo*. De esta forma, se logró comparar el comportamiento de los genes *dot/icm* estos dos pHs ácidos con el crecimiento a pH óptimo (pH 7,0).

En las Figuras 42, 43, 44 y 45 se observa claramente una tendencia a la sobreexpresión de los genes *dot/icm* a pH ácido, en especial en el pH 4,0. Se pudo determinar que el número de copias del transcrito de estos genes es superior en 2 logaritmos a pH 4,0 que a pH 7,0 y en 1 logaritmo a pH 5,5 que a pH 7,0. La inducción de la expresión de los genes *dot/icm* se dispara a las dos horas de incubación con pH ácido, y paulatinamente comienza a disminuir

a medida que el tiempo avanza en las cinéticas de crecimiento, aunque siempre fue mayor a pH ácido.

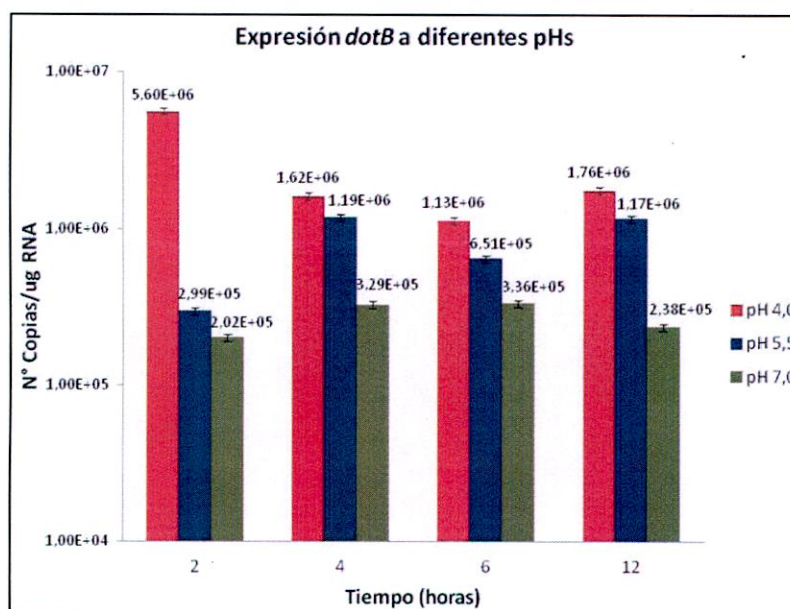


Figura 42: QRT-PCR de la expresión del gen *dotB* de *P. salmonis* durante el crecimiento de la bacteria a diferentes pH. La expresión de *dotB* a pH 4,0 está del orden de 10^6 un logaritmo más que a pH 7,0.

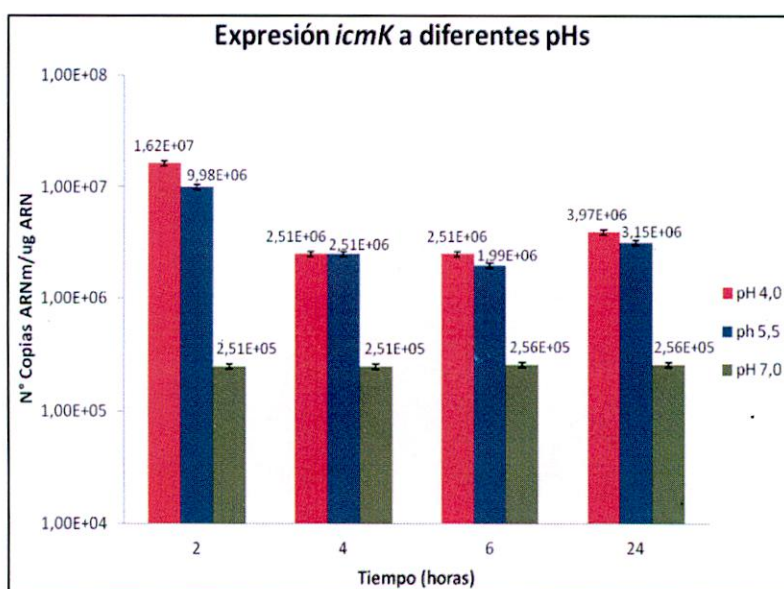


Figura 43: QRT-PCR de la expresión del gen *icmK* de *P. salmonis* durante el crecimiento de la bacteria a diferentes pH. El número de copias del transcrito de *icmK* a 2 horas de crecimiento supera en 2 logaritmos al mismo tiempo de incubación a pH 7,0.

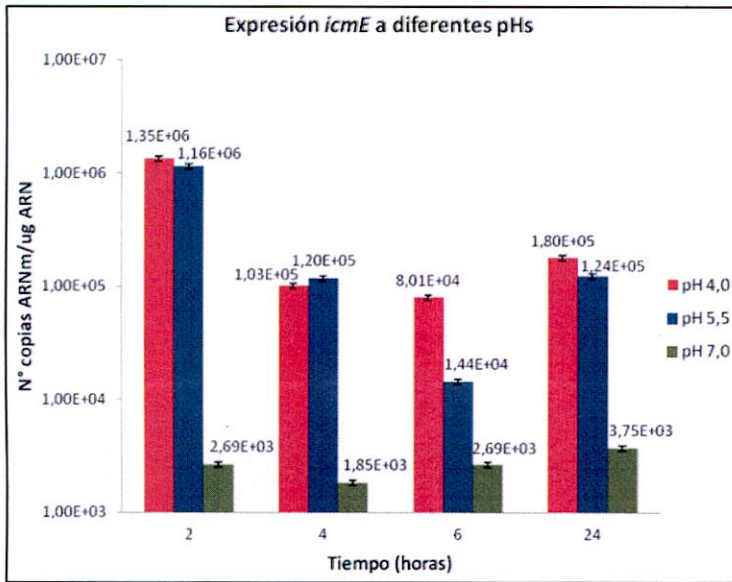


Figura 44: QRT-PCR de la expresión del gen *icmE* de *P. salmonis* durante la cinética de crecimiento a diferentes pHs. La expresión de este gen a pH 4,0 es superior 2 logaritmos que a pH 7,0 en todos los tiempos de incubación.

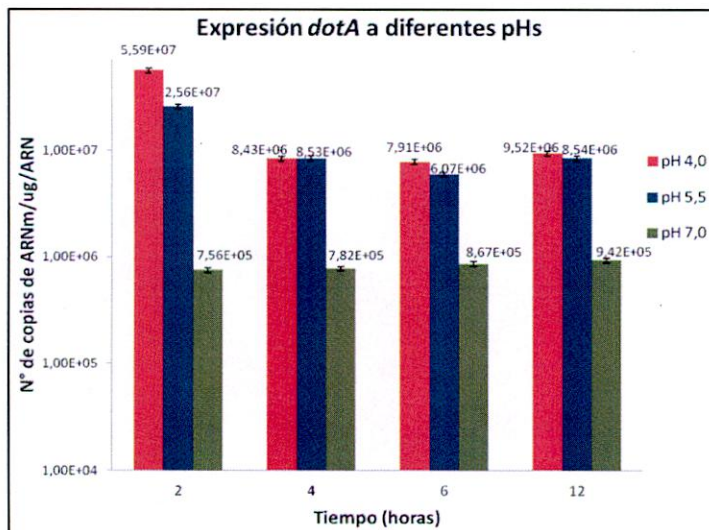


Figura 45: QRT-PCR de la expresión del gen *dotA* de *P. salmonis* durante la cinética de crecimiento a diferentes pHs. La sobreexpresión de *dotA* sigue el mismo patrón de los demás genes, existiendo una inducción marcada a las 2 horas de incubación a pHs ácidos. Para luego ir disminuyendo en el tiempo.

En este caso la secuencia del ITS también fue utilizada para monitorear la expresión general de genes en *P. salmonis* al realizar el crecimiento en diferentes pH. Se observó claramente que la expresión de este marcador fue mucho más alta a pH neutro que ácidos, aunque están dentro del mismo rango de logaritmo (10^8) (Figura 46). Además a pH 4,0 la expresión es mucho menor que con las otras condiciones, bajando un logaritmo (10^7) a partir de las 4 horas de incubación en esa condición.

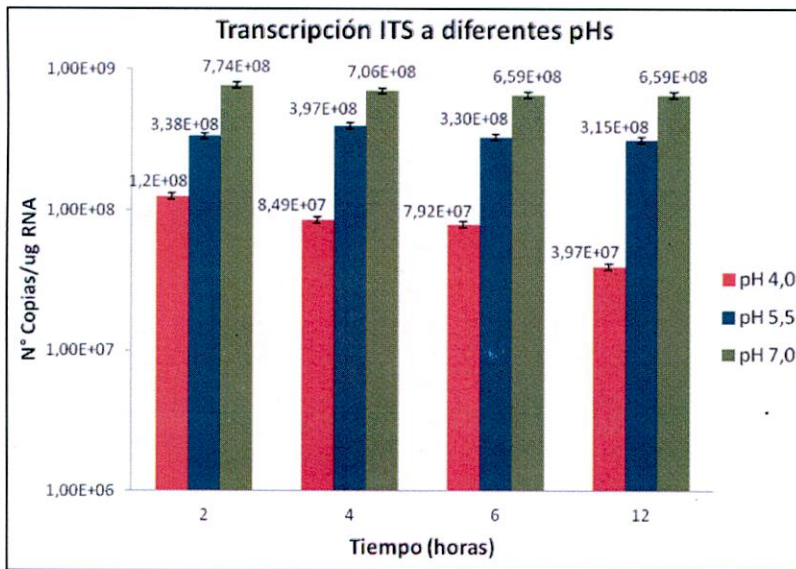


Figura 46: QRT-PCR de la transcripción de la región ITS del operón ribosomal de *P. salmonis* durante la cinética de crecimiento a diferentes pHs. Se observa una tendencia a disminuir la transcripción de este macrador a pH ácido a medida que avanza el tiempo de crecimiento en esas condiciones, en comparación con pH neutro.

Los resultados obtenidos demuestran que los genes del sistema Dot/Icm de *P. salmonis* están transcripcionalmente activos y que además parecen tener una expresión constitutiva en diferentes condiciones de crecimiento de la bacteria, ya sea durante el crecimiento en líneas celulares (infección) como en medios libres de células. Además, se observó que ciertas condiciones ambientales podrían gatillar una sobreexpresión de éstos, como ocurrió para el pH ácido, que mostró un nivel de expresión mucho mayor que a pH neutro.

7.3.3 EXPRESIÓN GENES FLAGELARES

P. salmonis es considerado un organismo inmóvil, por ese motivo la existencia de un set de genes relacionados con la biosíntesis flagelar podría refutar aquella teoría. Con la finalidad de determinar si los genes flagelares están transcripcionalmente activos se realizó un ensayo de RT-PCR. Para ello se seleccionaron 3 genes importantes en la cascada inicial de expresión de genes flagelares: *flrA* (activador σ^{-54} dependiente), *fliA* (σ^{28}) y *flhF* (gen regulador). La expresión fue evaluada durante el crecimiento de la bacteria en medio MC1 a 24 horas de haber realizado el inóculo, utilizando el gen de *ChaP.s* como control transcripcional de la bacteria. Como se puede ver en la figura 47, la expresión del gen *flrA* es baja en comparación con *fliA*, e incluso en el segundo cultivo la amplificación por RT-PCR es casi imperceptible, lo que indicaría que si transcripción es baja al menos en esa condición de crecimiento. Para *fliA* la expresión detectada por RT-PCR es alta en ambos cultivos

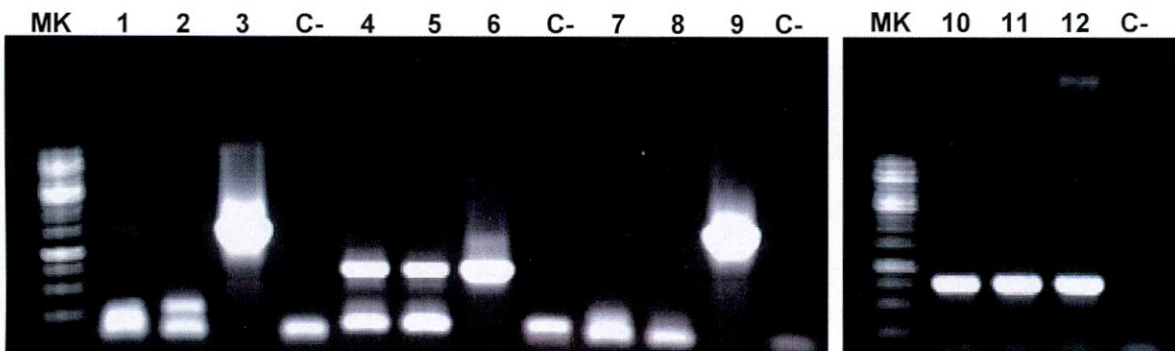


Figura 47: RT-PCR de genes reguladores de la de la cascada de expresión flagelar.

MK: Marcador DNA 10 Kb; **1:** *flrA* cultivo 1; **2:** *flrA* cultivo 2; **3:** PCR de *flrA* desde DNA de *P. salmonis* (C+); **4:** *fliA* σ^{28} cultivo 1; **5:** *fliA* σ^{28} cultivo 2; **6:** PCR *fliA* σ^{28} desde DNA de *P. salmonis*; **7:** *flhF* cultivo 1; **8:** *flhF* cultivo 2; **9:** PCR *flhF* desde DNA de *P. salmonis*; **10:** *ChaP.s* cultivo 1; **11:** *ChaP.s* cultivo 2; **12:** PCR *ChaP.s* desde DNA de *P. salmonis*; **C-:** Blanco (Control negativo de PCR).

7.4 GENERACIÓN DE ORGANISMOS *KNOCK OUT* PARA EVALUAR IMPORTANCIA DE GENES DEL SSTIV EN LA PATOGENICIDAD

Con la finalidad de determinar la importancia de los genes *dot/icm* en la virulencia y patogenicidad de la bacteria, se propuso realizar un *Knock out* de éstos con el sistema TargeTron™ (Sigma-Aldrich).

Para lograr realizar este propósito, en primer lugar se buscó una secuencia promotora propia de *P. salmonis* para asegurar la expresión del intrón (Targetron) para que ocurriera la correcta inserción de éste en los genes blanco. En segundo lugar, se optimizó la transformación genética de la bacteria, proceso que no ha sido descrito hasta la actualidad. Finalmente, se prueba el sistema de *Knock out* en la bacteria.

7.4.1 BÚSQUEDA DE SECUENCIAS PROMOTORAS PROPIAS DE *P. SALMONIS*.

Se ha descrito para otros patógenos intracelulares facultativos que la utilización de secuencias promotoras propias aumenta considerablemente la expresión de genes reporteros. Por ese motivo es que se comenzó la búsqueda de secuencias promotoras propias de la bacteria. Este objetivo se realizó con anterioridad a la secuenciación del genoma de la bacteria, por tanto se partió desde cero. Dos técnicas fueron utilizadas para lograr este propósito.

A) PCR RAGE (Rapid Amplification of Genomic Ends)

Esta técnica, basada en PCR (ver metodología) se utilizó para encontrar las regiones promotoras del gen de la proteína ChaP.s (HSP60) y del operón ribosomal (16S-23S). Una vez realizada la digestión del ADN con las enzimas de restricción seleccionadas y poliadenilado el ADN. Se realizó el primer PCR del RAGE con cebadores dirigidos a amplificar río arriba del gen de ChaP.s y del 16S. Después del segundo PCR del RAGE se obtuvo como resultado una amplificación con cebadores dirigidos a ChaP.s, pero no con los del 16S (Figura 48). La amplificación obtenida del RAGE de ChaP.s fue clonada y enviada a secuenciación.



Figura 48: RAGE2-PCR del 16S y ChaP.s. Gel agarosa 1%. MK: marcador ADN 100 pb. 1: RAGE 2 16S. 2: RAGE 2 ChaP.s, la flecha indica el producto amplificado.

La secuenciación de los clones obtenidos a partir del RAGE2 de ChaP.s fue analizada por BLASTN y arrojó como resultado que se había obtenido completo el gen *groes* (HSP10) (Figura 49), debido a que ambas chaperonas siempre están formando un operón bicistrónico, pero no se alcanzó a obtener la secuencia promotora.

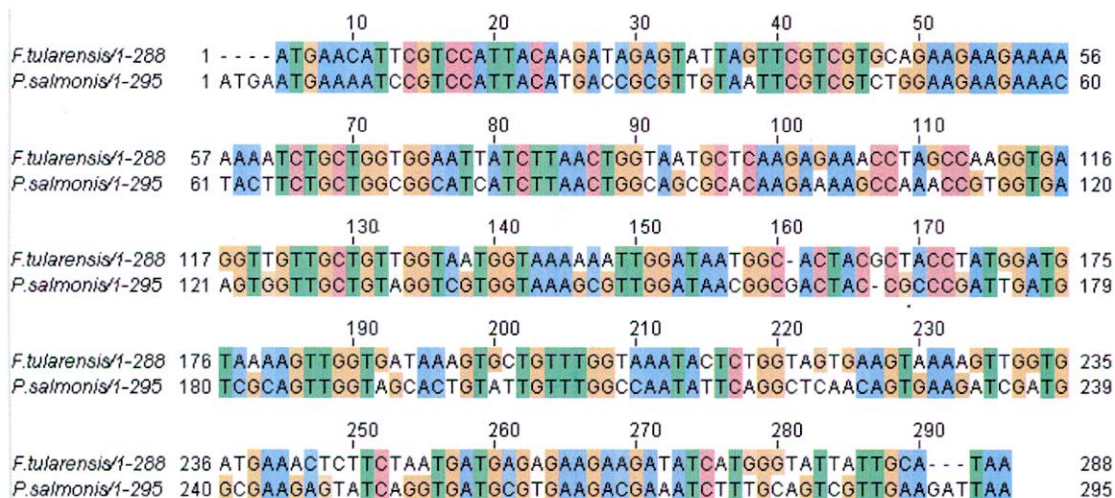


Figura 49: Alineamiento de la secuencia nucleotídica de GroES de *P. salmonis* con GroES de *F. tularensis* (Genbank: CAA67359.1) por ClustalW, se observa un alto grado de similitud entre las secuencias. La figura fue procesada con Jalview.

Una vez obtenida la secuencia del gen *groES*, se procedió a realizar otro RAGE, pero esta vez con cebadores diseñados sobre la secuencia del gen de la HSP10. Se logró amplificar un producto de aproximadamente 500 pb. El clonamiento y secuenciación de esta secuencia con BLASTN, contenía 100 nucleótidos del extremo amino del gen *groES* y 400 más río arriba del gen. Los 400 pb río arriba del ATG fueron analizados con Bprom (Softberry), lo que demostró que esa región correspondía a la secuencia promotora del operón *groES-ChaP.s* (Figura 50).

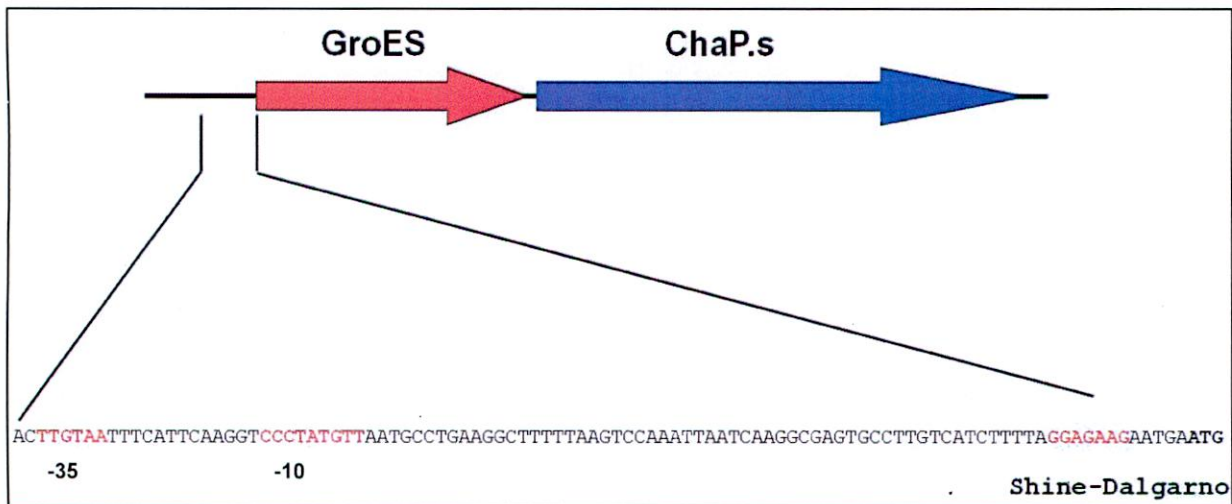


Figura 50: Esquema de la organización de operón *groES-ChaP.s*.

La flecha roja indica al gen *groES* y la azul a *ChaP.s*. Río arriba de *groES* se indica parte de la región promotora, resaltando las secuencias -10, -35 y Shine-Dalgarno (RBS o sitio de unión al ribosoma).

B) Librería genómica de *P. salmonis*

La segunda estrategia utilizada fue la construcción de una librería genómica de *P. salmonis* utilizando ADN cromosomal parcialmente digerido con la enzima *Sau3AI*, fragmentos que posteriormente fueron clonados en el vector pBluescript SK+.

De las secuencias analizadas por BLASTN y BLASTX, se seleccionó una de 992 pb que contenía dos ORFs putativos. Al determinar la identidad de éstos se comprobó que correspondían a un operón que estaba formado por éstos dos genes. Después de analizar el producto clonado con FgenesB, se comprobó que el primer gen tenía 228 pb (ORF1) y el segundo 408 pb (ORF2). Las secuencias de proteína putativa entregada por FgenesB de

cada uno de los ORF fueron sometidas a un análisis con BLASTP, logrando identificar que el ORF1 codifica para la proteína VapB (antitoxina) y el ORF2 para VapC (toxina), ambas forman parte del sistema toxina-antitoxina (TA) bacteriano VapBC, cuya función es participar en la muerte celular programada en bacterias o en la formación de células persistentes (Gómez *et al.*, 2011). Mediante el uso de Bprom río arriba del gen *vapB* se logró determinar la región promotora de operón bicistrónico TA *vapBC*, que comparte varias características con las regiones promotoras de otros sistemas de la misma familia, como es el caso de un par de secuencias repetidas invertidas (IRs) entre las regiones -10 y -35 (Figura 51).

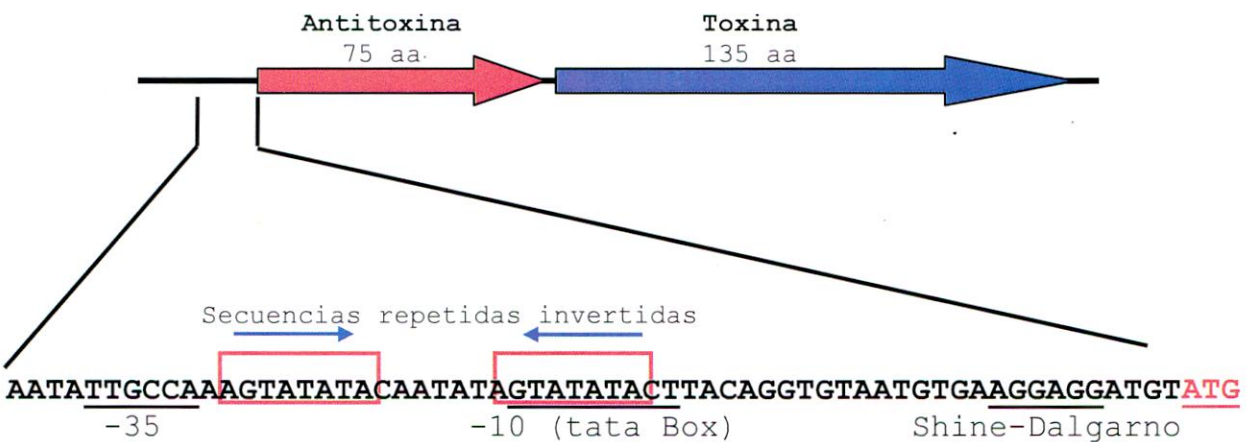


Figura 51: Representación esquemática de la organización del operón TA *VapBC* de *P. salmonis*.

En rojo está representado el gen de la antitoxina VapB y en azul el del la toxina VapC. Río arriba de *vapB* se encuentra la región promotora. Subrayada está el Shine-Dalgarno y las regiones -10 y -35. Los cuadros rojos indican las regiones repetidas invertidas.

7.4.2 TRANSFORMACIÓN DE *P. SALMONIS*

Con la fin de lograr el *Knock out* de los genes de secreción, se realizaron diferentes pruebas para lograr la incorporación de material genético exógeno a *P. salmonis*.

En primer lugar, se realizó la construcción de dos vectores que contuvieran como gen reportero *cat* (resistencia al antibiótico Cloranfenicol) bajo la regulación de la región promotora del operón *groES-ChaP.s*, generando de esta forma un cassette de expresión para la transformación de *P. salmonis* con una secuencia promotora endógena de la bacteria. Los vectores utilizados para la inserción del cassette fueron pCU18 y pCR2.1 TOPO TA. Los nuevos vectores (pCU18/*GroES-ChaPs+cat* y pCR2.1 TOPO/*GroES-*

ChaPs+cat) fueron utilizados para realizar diferentes experiencias de transformación en *P. salmonis*.

Se llevaron a cabo 4 técnicas de transformación para lograr incorporar los plásmidos en la bacteria, estas incluyeron: biobalística, la electroporación, quimiotransformación y conjugación.

A) Biobalística

Para la biobalística se utilizaron dos plásmidos, los que fueron adheridos a partículas de tungsteno M5 tal como fue descrito en materiales y métodos. Los proyectiles de tungsteno/plásmido fueron lanzados a 1100 psi de presión y a 6 cm de distancia de la zona de lanzamiento de las partículas. Después de 48 horas de incubación de las bacterias bombardeadas, éstas fueron traspasadas a placas con el agente de selección (Cloranfenicol 5 µg/ml). Las placas fueron incubadas hasta 1 mes pero no obtuvieron colonias transformantes, a pesar que los controles bombardeados con tungsteno y sembrados en placas sin agente de selección crecieron normalmente. La experiencia fue repetida en 4 oportunidades sin lograr resultados positivos de transformación.

B) Electroporación

Para la electroporación se utilizaron dos protocolos diferentes.

El primero de ellos, descrito para *L. pneumophila* y *C. burnetii*, utilizaba sacarosa 0.5 M para la generación de células. Se utilizó 3 µg de cada plásmido para realizar la electroporación, con las condiciones descritas en la metodología. Después de 4 o 6 horas de incubación de las células electroporadas en medio MC1 a 100 rpm de agitación y a 23°C, las bacterias fueron sembradas en placas de agar sangre en presencia del maracador de selección Cloranfenicol. Las placas fueron incubadas hasta 1 mes pero no se obtuvieron transformantes.

El segundo protocolo de transformación utilizado fue aquel descrito para bacterias del género *Vibrio*, utilizando un buffer con 272 mM de sacarosa y 2 mM de MgCl₂ para la producción de

las células electrocompetentes. Las células fueron electroporadas en las condiciones antes descritas, posterior a la incubación en medio MC1 sin antibiótico, se sembraron en placas con el antibiótico Cloranfenicol. Las células fueron incubadas hasta 1 mes a 23°C pero no se observaron transformantes.

C) Quimiotransformación

Para la quimiotransformación, las células competentes fueron procesadas con 0,1 M de CaCl₂, MgCl₂ y FeCl₂. Se utilizó 1 µg de cada plásmido para la transformación que fue realizada de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Después del shock de temperatura las células fueron incubadas en medio MC1 por 4 o 12 horas para ser posteriormente sembradas en placas de agar sangre en presencia de Cloranfenicol. Las placas fueron incubadas hasta 1 mes a 23°C pero una vez más, no se observaron colonias transformantes.

D) Conjugación

Para la conjugación se utilizó sólo el plásmido pCU18, sin la presencia del cassette *groES/ChaP.s+cat*, pero con la región de movilidad (genes Tra) del plásmido pRP4 (pCU18+MOB), con la finalidad de asegurar la transferencia del vector desde la cepa donadora. La conjugación con pCU18 fue ensayada en *F. tularensis* con éxito, por tanto, se procedió a realizar el protocolo con *P. salmonis* tal como está descrito en materiales y métodos. Como cepa donadora se usó a *E. coli* DAPA λ-pir. Después de haber realizado el procedimiento de transformación, las bacterias conjugantes fueron sembradas en placas de agar sangre con Cloranfenicol y en ausencia de DAPA, incubando por 3 semanas las placas a 23°C. Tal como se vio anteriormente con los otros protocolos, no se logró el crecimiento de colonias transformantes.

7.4.3 KNOCK OUT DEL GEN DE CHaP.S DE *P. SALMONIS* EN *E. COLI*

Debido a que no fue posible la transformación de *P. salmonis* con las 4 técnicas ensayadas, se procedió a generar un modelo del *Knock out* para el gen de ChaP.s con el sistema TargeTron™ (Sigma-Aldrich).

A) Modificación del Intrón y construcción de los vectores de *Knock out*

Para poder dirigir la inserción del intrón al gen ChaP.s este debió ser modificado con un sistema de PCR con 4 cebadores para incorporar los sitios de reconocimiento del gen al intrón, usando como templado 100 ng de ADN del intrón. Se seleccionaron dos posibles sitios de inserción, en el nucleótido 273 y en el 1021 de la secuencia de ChaP.s. El PCR funcionó exitosamente, se obtuvo el producto esperado de 350 pb (Figura 52).

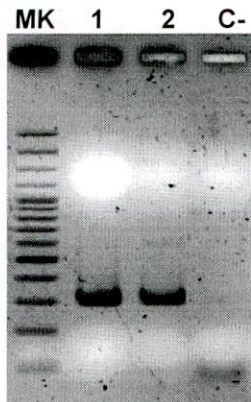


Figura 52: PCR con 4 cebadores para la modificación del intrón. Gel agarosa 1%. **MK:** Marcador de ADN de 100 pb. **1:** PCR para el sitio 273. **2:** PCR para el sitio 1021. **C-:** control negativo de PCR.

Una vez amplificada la región del intrón modificada, esta fue sometida a doble digestión con las enzimas *HindIII* y *BsGI*, para luego ser ligada en el vector de mutagénesis pACD4+ en presencia de la enzima T4 DNA ligasa. El vector con los intrones modificados fueron posteriormente transformados en células quimiocompetentes de *E. coli* TOP10 y sembradas en placas con 25 ug/ml de Cloranfenicol. Las colonias positivas fueron seleccionadas cromatogenicamente por la presencia X-Gal (colonias blancas).

B) Knock out de ChaP.s

Una vez seleccionadas las colonias transformantes que contenían el vector con el intrón modificado, se procedió a realizar el *Knock out* del gen de ChaP.s. Para ello, ChaP.s fue previamente clonada en el vector pBluescript SK+ (Amp^r). Se realizó una transformación doble en células quimiocompetentes de *E. coli* TOP10 con el vector pBluescript+ChaP.s y con el vector de mutagénesis que contenía al intrón modificado para cada uno de los sitios de inserción del intrón en ChaP.s. Los transformantes fueron seleccionados en placas LB que contenían los dos antibióticos de selección para cada plásmido (Ampicilina para pBluescript y Cloranfenicol para pACD4+intrón), de esta forma se podrán seleccionar colonias que contengan los dos plásmidos. Una vez obtenidas las colonias transformantes, éstas fueron cultivadas en medio LB líquido por 12 horas en presencia de los dos agentes de selección. Del cultivo anterior se usaron 50 µl para inocular 2 ml de medio LB con ampicilina y Cloranfenicol, los que fueron incubados por 2 horas a 37°C, para luego inducir la expresión del intrón con IPTG, incubando por dos horas adicionales a 30°C. Finalmente, 100 µl del cultivo fueron utilizados para inocular 5 ml de medio LB suplementado con 25 µg/ml de Kanamicina y 100 µg/ml Ampicilina (este último para pBluescript), ya que el intrón tiene un cassette de resistencia a ese antibiótico, el que se activa solamente cuando se ha insertado en el gen blanco. Los cultivos fueron incubados a 200 rpm por 16 horas y a 37°C. Sólo se observó crecimiento bacteriano en los cultivos correspondientes al intrón dirigido a insertarse en el nucleótido 1021 de ChaP.s y no así, para aquel en el nucleótido 273. Al haber crecimiento en presencia de Km indica que la inserción se realizó exitosamente, pero para comprobar completamente el *Knock out*, se realizó un PCR al cultivo con un cebador forward anclado en el inicio de ChaP.s (F9) y un reverse anclado en el intrón, obteniendo como resultado un producto amplificado de 1300 pb, tamaño esperado al sumar el tamaño del inicio del intrón con los 1021 pb de ChaP.s donde ocurrió la inserción (Figura 53). Se concluye que el *Knock out* ocurrió correctamente en ese sitio de inserción.

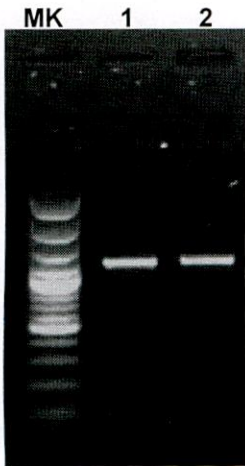


Figura 53: Validación por PCR de la inserción del intrón en en el nucleótido 1021 de ChaP.s. Gel agarosa 1%. **MK:** Marcador de 100 pb. **1:** DNA derivado del cultivo 1; **2:** DNA derivado del cultivo 2.

8. DISCUSION

La bacteria *P. salmonis* desde su aparición en la salmonicultura nacional (Bravo y Campos, 1989) ha sido el patógeno de mayor relevancia y con mayor incidencia. A pesar de que los esfuerzos por controlar la enfermedad han sido considerables, ésta no ha podido ser erradicada de los centros de cultivo debido a la aparición de cepas cada vez más virulentas y refractarias a los tratamientos con antimicrobianos. Además, se suma la posibilidad de generar una infección persistente y asintomática en los peces (Sergio Marshall, comunicación personal).

Siendo *P. salmonis* un patógeno de alto impacto en la salmonicultura de nuestro país, aspectos básicos sobre su biología y ciclo de vida aún son completamente desconocidos. Sumado a que la caracterización genética de la bacteria es prácticamente nula, salvo por recientes reportes de genes de importancia publicados por el grupo de investigación de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (Rojas *et al.*, 2008; Marshall *et al.*, 2011; Gómez *et al.*, 2011; Marshall *et al.*, 2012). Aspectos relevantes del comportamiento en el estadio intracelular de la bacteria son desconocidos totalmente y por ende sus mecanismos de virulencia y patogenicidad no han podido ser dilucidados.

Muchas bacterias patógenas de animales y humanos logran colonizar diferentes partes del organismo, logrando evadir las primeras barreras físicas de defensa como la piel, epitelios, etc., logrando diseminarse por el torrente sanguíneo o por diferentes tejidos (Lee and Schneewind, 2001). La entrada de los patógenos al organismo va acompañada de la respuesta inmune, en la cual el sistema inmune del huésped reconoce los productos bacterianos (lípidos, carbohidratos, peptidoglicano o proteínas) y responde con el ataque de los macrófagos u otras células como un esfuerzo de eliminar al invasor (Medzhitov y Janeway, 1999). Muchas bacterias patógenas han desarrollado evolutivamente tácticas que les permiten evadir la respuesta inmune del huésped y multiplicarse en las células tales como los macrófagos o leucocitos polimorfonucleares (Finlay y Falkow, 1997). Las estrategias de los patógenos son considerablemente diversas y en general involucran la manipulación del comportamiento del organismo huésped para su beneficio, pudiendo hacer una división de éstas en tres categorías: i) adhesión, ii) secreción de toxinas al espacio intercelular y iii) la inyección de factores de virulencia directamente al citoplasma de las células del huésped (Lee y Schneewind, 2001).

El principal objetivo de este trabajo de Tesis Doctoral fue dilucidar al menos una de estas tres categorías en la bacteria patógena *P. salmonis*, con el fin de comprender mejor los mecanismos que utiliza este organismo para lograr multiplicarse en el huésped, generando una infección productiva y por ende desarrollar la enfermedad. Este estudio se centró principalmente en la búsqueda de genes de los diferentes sistemas de secreción presentes en bacterias Gram-negativas, debido a que éstos tienen gran relevancia en la virulencia y patogenicidad, ya que permiten la exportación de toxinas y efectores de virulencia que facilitan la invasión. Muchas proteínas efectoras de virulencia secretadas por bacterias patógenas, a través de los diferentes sistemas de secreción, les confieren la habilidad de modificar el comportamiento de las células huésped y por ende logran evadir el sistema inmune para poder multiplicarse y diseminarse en el organismo. Siendo este último punto la principal razón de la búsqueda de los sistemas de secreción en *P. salmonis*.

Utilizando diferentes estrategias para hallar los genes de secreción en *P. salmonis*, desde una técnica basada en PCR con cebadores degenerados hasta la secuenciación parcial del genoma de la bacteria, se logró obtener como resultado que este patógeno contiene en su genoma a: SSTI, Pili Tipo IV, SSTIV (Dot/lcm) y también, presenta codificado genes flagelares, que podrían tener alguna implicancia en la patogenicidad. Además, se determinó que todos los genes encontrados en el desarrollo de esta tesis están transcripcionalmente activos y que al menos el ARNm de éstos es sintetizado en diferentes condiciones de crecimiento de la bacteria.

8.1 SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO I

8.1.1 Presencia de genes del SSTI en el genoma de *P. salmonis*

Utilizando la técnica basada en PCR con cebadores degenerados se encontró un gen del SSTI, que corresponde a *hlyD* (proteína de canal intermembrana HlyD). Posteriormente, la secuenciación parcial del genoma de la bacteria entregó la información de la presencia de al menos dos genes relacionados con el sistema. Uno de esos genes es *tolC*, gen estructural que codifica para la proteína de membrana externa o porina TolC, y el segundo corresponde a *hlyA* que codifica para la toxina α -hemolisina o HlyA. No se ha detectado la presencia del transportador ABC del sistema (ATPasa). El SSTI está presente en un amplio rango de bacterias Gram-negativas y está involucrado en la secreción de diversos sustratos como

proteasa, lipasas y hemoforos (Masi y Wandersman, 2010). Los componentes del SSTI no están permanentemente asociados y su ensamblaje es iniciado por la unión del transportador ABC (ATPasa o proteína HlyB) al sustrato (Ghigo y Wandersman, 1994).

El SSTI mejor caracterizado corresponde al responsable de la secreción de la toxina α -hemolisina (HlyA) en cepas de *E. coli* uropatogénicas, importante factor de virulencia por su actividad citotóxica y lítica ante un amplio rango de células (eritrocitos, granulocitos y monocitos, entre otros) (Gentshev *et al.*, 2002), ya que estas toxinas tienen dominios de unión a fosfolípidos, lo que produce la desestabilización de las membranas celulares generando poros que producen el intercambio de iones y despolarizan la membrana (Bhakdi *et al.*, 1986). La presencia del gen de la α -hemolisina en el genoma de *P. salmonis* podría explicar el hecho de que en infecciones *in vivo* con la bacteria, muchas células hepáticas y renales son lisadas, dejando a esos órganos no funcionales, y que en cultivos celulares de macrófagos y monocitos infectados ocurre una lisis celular generalizada de los cultivos entre 10 a 15 días post-infección (Rojas *et al.*, 2009).

8.1.2. Expresión de los genes del SSTI

Los niveles de expresión de los genes *tolC*, *hlyD* y *hlyA* en *P. salmonis* fueron detectados por RT-PCR convencional, demostrando que están activos transcripcionalmente y que son expresados tanto en crecimiento en medio líquido, como también durante la infección de la línea celular RTS11 (monocitos/macrófagos) (Figuras 38 y 39).

La expresión del gen *hlyD* es relativamente baja (Figura 39) en comparación con los otros genes del sistema, tanto en crecimiento líquido, como también durante la infección de las líneas celulares. Este hecho puede ser explicado porque en *E. coli* los genes del SSTI están organizados formando el operón *hlyCABD*, y la expresión de éste es extremadamente polar, siendo el gen *hlyD* el último en la secuencia, además de existir en los espacios intergénicos regiones terminadoras Rho-independientes, lo que disminuye considerablemente el nivel de expresión del gen siguiente (Welch y Pellett, 1988). Hasta el momento en *P. salmonis* no se ha podido armar el operón completo que forman los genes del SSTI, ya que en la secuenciación del genoma de la bacteria estos genes están en contigs de pequeño tamaño, pero presumiblemente debería tener la misma organización que otros operones de los SSTI, la que es bastante conservada.

8.2 Pili Tipo IV

8.2.1. Presencia genes Pili Tipo IV en el genoma de *P. salmonis*

El Pili Tipo IV se caracteriza por ser largos filamentos encontrados en la superficie de muchas bacterias Gram-negativas y que median un amplio rango de funciones entre las que se incluyen la adhesión, motilidad, formación de microcolonias y secreción de proteasas y factores de colonización (Craig y Li, 2008).

En este trabajo se han encontrado tres genes pertenecientes al Pili Tipo IV, *pilQ*, *pilB* y *fimT*, los que codifican para proteínas estructurales del sistema. Anteriormente ha sido reportado en *P. salmonis* unas estructuras llamadas PAC (*P. salmonis* Attachment Complex), las que según los autores podrían estar implicadas en la adherencia y anclaje de la bacteria a las células blanco (Larenas *et al.*, 2003). Estas estructuras llamadas PAC tienen las características principales del pili Tipo IV, como se puede observar en la Figura 54, por lo que éstas podrían corresponder finalmente al Pili Tipo IV, lo que avalaría con un resultado funcional a los hallazgos a nivel genético encontrados en este trabajo, pero aún este punto deberá ser más estudiado a futuro.

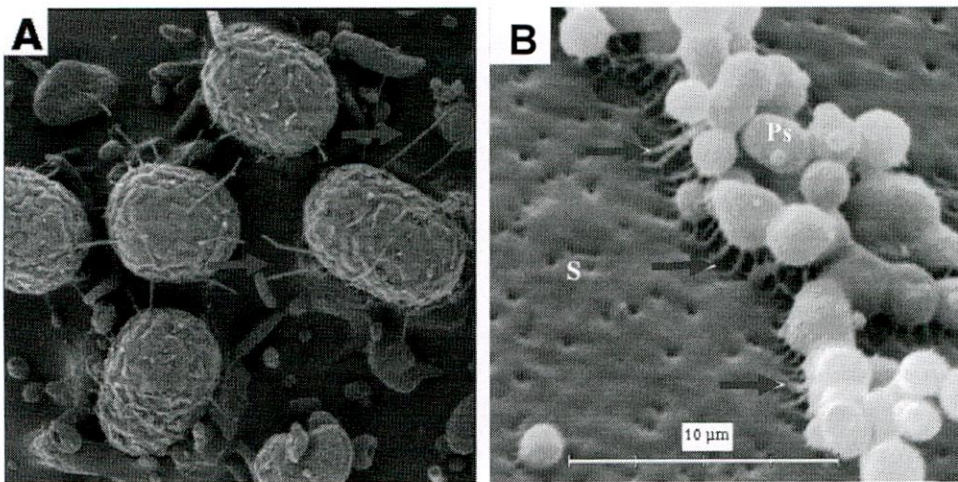


Figura 54: Comparación entre el Pili Tipo IV de *E. coli* y el sistema PAC de *P. salmonis*.

A: Microscopía electrónica de barrido de *E. coli* uropatogénica en la que se pueden observar las prolongaciones del Pili Tipo IV (Tomada de Xicohtencatl-Cortes *et al.*, 2007); **B:** Microscopía electrónica de barrido donde se puede observar el sistema PAC de *P. salmonis* (Tomada de Larenas *et al.*, 2003). Las flechas rojas indican las prolongaciones celulares correspondientes al pili Tipo IV y al sistema PAC en *E. coli* y *P. salmonis* respectivamente.

En *F. tularensis* el Pili Tipo IV es crucial para la virulencia de la bacteria, ya que participa en la adhesión, como también en la exportación de enzimas que facilitan la colonización de las células blanco (proteasas, lipasas y quitinasas), reportándose que una disrupción en el ensamblaje de la estructura del pili produce una reducción en la virulencia (Chakraborty *et al.*, 2008). El Pili Tipo IV también ha sido reportado en *Aeromonas hydrophila*, *Azoarcus spp.*, *Bacteroides ureolyticus*, *Branhamella catarrhalis*, *Comomonas testosteroni*, *Dichelobacter nodosus*, *Eikenella corrodens*, *Kingella denitrificans*, *K. kingae*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella bovis*, *M. lacunata*, *M. nonliquefaciens*, *M. kingii*, *Neisseria meningitidis*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas stutzeri*, *P. putida*, *P. syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Shewanella putrefaciens*, *Suttonella indologenes*, *Synechocystis sp.*, *Vibrio cholerae*, y *Wolinella spp.*, muchos de los cuales son patógenos de animales, plantas y hongos (Mattick, 2002). En *V. cholerae* el Pili Tipo IV es crucial para la formación de biofilm, participando en la adhesión inicial célula-célula y adhesión al sustrato, siendo la formación de biofilm una característica distintiva de la virulencia de este patógeno, ya que es requerida para colonizar las células intestinales (Watnick y Kolter, 1999). Recientemente se ha reportado que *P. salmonis* es capaz de generar biofilm en condiciones estresantes de creciendo *in vitro* (Marshall *et al.*, 2012), por lo que las estructuras relacionadas al Pili Tipo IV podrían estar involucradas en este proceso y podría tener implicancia en la supervivencia del patógeno en el ambiente marino, así como también en la colonización inicial del huésped, similar a lo descrito en *V. cholerae*.

Conociendo la presencia de genes pertenecientes al pili en *P. salmonis*, y en base a información previa en otros organismos, se puede señalar que esta estructura debería tener alguna incidencia en la virulencia en la bacteria, ya sea en la adhesión o en la secreción de moléculas que permitan colonizar a las células del huésped.

8.3 SSTIV (DOT/ICM)

8.3.1. Presencia genes *dot/icm* en el genoma de *P. salmonis*

El SSTIV es ampliamente conservado en diferentes organismos, en los cuales es un determinante de virulencia crucial, ya sea por la exportación de proteínas o ADN, como también en la transferencia de genes de virulencia (Rikihisa *et al.*, 2010).

En este trabajo se encontraron 4 genes estructurales pertenecientes al SSTIV-B, específicamente del sistema Dot/Icm, *dotB*, *dotA*, *icmK* e *icmE*. En base de las secuencias disponibles de los TIVSS genes Dot/Icm de los patógenos *L. pneumophila* y *C. burnetii*, fueron diseñados cebadores degenerados en regiones conservadas de proteínas estructurales de este sistema con la finalidad de hallar secuencias homólogas en el genoma de *P. salmonis*. Utilizando esta estrategia fue posible encontrar en *P. salmonis* dos genes *dot/icm*, *dotB* e *icmK*. Un tercer gen, *icmE*, se obtuvo mediante la estrategia de LR-PCR y el cuarto, *dotA*, se obtuvo de la secuenciación parcial del genoma de la bacteria.

El análisis por BLASTX mostró que gen putativo *dotB* codifica una proteína putativa con un grado de identidad de un 69% y 68% de similitud con la ATPasa DotB en *L. pneumophila* y *C. burnetii*, respectivamente (Tabla 17). Una vez obtenida la secuencia completa de este gen a través de la secuenciación parcial del genoma de *P. salmonis* se pudo determinar que ésta contiene dos dominios conservados distintivos de la familia P-loop NTPasa (Figura 37-A): el primero consiste en una región de unión a ATP, conocida como motivo Walker A (GxxxxGK[S/T]); y el segundo es el motivo Walker B motif (hhhh[D/E], donde "h" es cualquier aminoácido hidrofóbico (Gangwar *et al.*, 2008). Los motivos Walker A y B se unen al fosfato de la molécula donadora (ATP o GTP) y al catión Mg^{2+} , respectivamente (Hubbard *et al.*, 2007). En la proteína DotB de *P. salmonis* el motivo Walker A involucra la secuencia GATGSGKS, la que es idéntica a sus homólogos en *L. pneumophila* y *C. burnetii*, mientras que el motivo Walker B corresponde a LILVGE, no siendo idéntico al de sus homólogos pero tiene las mismas características fisicoquímicas. En *L. pneumophila* la proteína DotB proteína ha sido muy bien caracterizada y además de su actividad de ATPasa se le han otorgado otras 3 funciones: i) participación en el ensamblaje del SSTIV; ii) proteína de exportación; y iii) retracción del pili (Sexton *et al.*, 2005). Adicionalmente, DotB contiene varias similitudes con ATPasas de otros SSTIV y del SSTII, características que también están presentes en la proteína de *P. salmonis*.

En el caso de *icmK*, fue posible encontrar una región del gen de esta proteína utilizando cebadores degenerados y posteriormente con la secuenciación parcial del genoma de *P. salmonis* se obtuvo la secuencia completa (Figura 37). En *L. pneumophila* *icmK* (DotH) es una proteína periplasmática y de membrana externa que forma parte del corazón estructural del sistema Dot/Icm en asociación con las proteínas DotC, DotD, DotF y DotG (*icmE*) (Andrews *et al.*, 1998; Vincent *et al.*, 2006), de las cuales las tres primeras aún no han sido identificadas en *P. salmonis*. La función de *icmK* en *L. pneumophila* es la formación del poro

en la membrana externa de la bacteria y es indispensable en el proceso de multiplicación intracelular provocar la muerte de los macrófagos (Morozova *et al.*, 2004).

Para el caso del tercer ORF, *icmE*, obtenido inicialmente por LR-PCR y posteriormente confirmado por la secuenciación parcial del genoma, el análisis por ClustalW mostró un alto grado de similitud presentado por la proteína putativa IcmE de *P. salmonis* con sus homólogos en *L. pneumophila*, *R. grylli* y *C. burnetii* (Figuras 35 y 37). Adicionalmente, IcmE mostró tener dominios conservados con la proteína de conjugación Trbl, similar a su homólogo en *L. pneumophila*, la cual comparte homología de secuencias con la proteína Trbl del plásmido IncP RK2 (Segal y Shuman, 1999). En *L. pneumophila* IcmE (DotG) se caracteriza por ser parte de la región central del aparato de secreción, dirigiendo la formación del canal de exportación dependiente de ATP, en donde la cascada involucra a DotF (asociada a IcmK, DotC y DotD) para transferir la energía del ATP a la membrana externa de la bacteria (Vincent *et al.*, 2006).

El último gen *dot/icm* encontrado en *P. salmonis*, mediante la secuenciación parcial del genoma, corresponde a *dotA* y a pesar de que no se ha obtenido completa la secuencia de este gen, se logró determinar que codifica una proteína altamente homóloga a DotA de *L. pneumophila*, *C. burnetii* y *R. grylli*. En *L. pneumophila* DotA es una proteína integral de membrana de 113 kDa, pero que también es exportada al medio extracelular durante el crecimiento de la bacteria en medio líquido (Nagai y Roy, 2001). DotA contiene ocho dominios hidrofóbicos y es esencial en la decisión inicial del tráfico del fagosoma que contiene a *L. pneumophila* en el interior de los macrófagos hacia la fusión con los lisosomas, una decisión fundamental del patógeno después de haber sido fagocitado por un macrófago (Roy *et al.*, 1998).

La caracterización de estos cuatro genes y sus respectivos productos proteicos en *P. salmonis* sugieren la existencia funcional de un sistema de secreción homólogo a los sistemas Dot/Icm de *L. pneumophila* y *C. burnetii* en *P. salmonis*, lo que implicaría la importancia de éstos en la patogenicidad de la bacteria. Cabe mencionar que en *L. pneumophila* y *C. burnetii* el sistema Dot/Icm juega un rol clave en la patogenicidad, ya que permite la sobrevivencia intracelular de las bacterias en los macrófagos (Sauer *et al.*, 2005). El sistema Dot/Icm fue caracterizado inicialmente en *L. pneumophila*, pero posteriormente éstos genes fueron encontrados en su totalidad en *C. burnetii* a excepción de *icmF* (Segal *et al.*, 2005).

La relación de los genes *dot/icm* en la patogenicidad de *L. pneumophila* fue determinado por mutagénesis, determinando la implicancia de cada uno de ellos en el crecimiento intracelular. Por el contrario, en *C. burnetii* los genes *dot/icm* fueron identificados por su homología a los de *L. pneumophila*, y su implicancia en la patogénesis nunca fue examinado directamente. En nuestro caso, la identificación de los genes *dot/icm* de *P. salmonis* fue realizada de la misma forma que para *C. burnetii*, solamente por homologías con los genes de este sistema presentes en las bases de datos. A pesar de esto, como ya ha sido mencionado, los genes de *P. salmonis* comparten una alta homología con los de otros sistemas Dot/Icm (Figuras 32, 33, 35, 36 y 37), incluido varios dominios altamente conservado entre ellas, pudiendo inferir que las funciones que presentan estos genes en *P. salmonis* son las mismas que para otros patógenos.

8.3.2. Expresión de los genes *dot/icm* durante infección *in vitro*

L. pneumophila se replica dentro de una vacuola citoplasmática en la célula huésped y para poder mantenerse en este nicho y sobrevivir el sistema Dot/Icm inyecta una gran cantidad de proteínas efectoras al citoplasma de la célula infectada (Segal *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 1998). La translocación de estos sustratos es esencial para la biogénesis de esta vacuola, la que adoptaría una estructura similar a un compartimento del retículo endoplasmático (rodeado de ribosomas), permitiendo de esta forma la protección de la bacteria para su posterior multiplicación intracelular (Shin y Roy, 2008). Mutaciones en los genes *dot/icm* en *L. pneumophila* evitan que la vacuola adopte la estructura de un compartimento similar al retículo endoplasmático, provocando que la bacteria entre directamente a la vía endocítica y sea degradada (Swanson y Isberg, 1995; Tilney *et al.*, 2001).

Al igual que *L. pneumophila*, *P. salmonis* se replica en el interior de una vacuola citoplasmática (Rojas *et al.*, 2008), en la cual está protegida y no es degradada en los macrófagos al menos a tiempos tempranos de infección (McCarthy *et al.*, 2008; Gómez *et al.*, manuscrito en revisión en PLoS One). Este efecto podría ser explicado por la activación o sobreexpresión de los genes *dot/icm* en tiempos tempranos de infección. En este trabajo se cuantificó la expresión de los 4 genes de este sistema encontrados en el genoma de *P. salmonis* en una cinética de infección *in vitro* en dos líneas celulares, RTS11 y Sf21 (24, 48 y 72 horas), mediante QRT-PCR. Se pudo observar que los niveles de expresión de los genes *dot/icm* en *P. salmonis* son altos en tiempos tempranos de infección en dos líneas celulares utilizadas, pero que el número de copias de ARNm de los 4 marcadores es superior a las 48

horas post-infección (Figura 40). Este fenómeno podría ser explicado debido a que *P. salmonis* tiene una baja tasa de crecimiento en líneas celulares (Sergio Marshall, comunicación personal), por lo que a las 48 horas de infección ocurriría la mayor fagocitosis de las bacterias por parte de las células de cultivo y por ende en ese tiempo se produce una mayor expresión de los genes *dot/icm*. Un evento similar ha sido observado en *C. burnetii*, patógeno que también tiene una baja tasa de crecimiento *in vitro*, en donde la expresión de *dotB* y otros genes del SSTIV no son detectables hasta después de 24 horas post-infección, y que sólo a 48 horas post-infección la bacteria es detectada en vacuolas dentro de las células de cultivo (Zamboni *et al.*, 2003). Durante la cinética de infección en las líneas celulares se utilizó como control positivo de expresión la cuantificación del transcrito de la región ITS, obteniendo como resultado un aumento gradual en el número de copias del mensaje de ITS a medida que avanza el tiempo de infección (Figura 41), a diferencia de lo que ocurre con los genes de secreción. Estos resultados indicarían que el sistema de secreción Dot/Icm participa activamente en la formación de la vacuola replicativa en las células infectadas, posiblemente por la exportación de moléculas que alteren el tráfico vesicular en las células infectadas y de esa forma evitar que la bacteria sea degradada por la vía endosomal, tal como ocurre con *L. pneumophila* y *C. burnetii*. Como ha sido mencionado anteriormente, en *L. pneumophila* la proteína DotA es expresada inmediatamente después de la fagocitosis, pero la bacteria parece no requerir su expresión continuamente para mantenerse en la vacuola de replicación, lo que indicaría que esta proteína es el efector responsable de regular el tráfico inicial del fagosoma al poco tiempo de haber sido fagocitada la bacteria por los macrófagos (Roy *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 2010). Este antecedente se correlaciona con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que después de las 48 horas de infección en las líneas celulares, tanto el gen *dotA*, como los otros 3 comienzan a disminuir la expresión, lo que indicaría que el sistema se está expresando activamente en ese tiempo de infección en donde DotA sería crucial para comenzar a interrumpir el tráfico vesicular del huésped y así poder establecerse la bacteria en el nicho intracelular.

8.3.3. Efecto del pH ácido en la expresión de los genes *dot/icm* en *P. salmonis*

La acidificación del fagosoma ha sido reportada como un inductor esencial de los genes implicados en la multiplicación intracelular de muchos organismos incluyendo *Mycobacterium*, *Chlamydia spp.*, *L. pneumophila*, *C. burnetii*, y *B. suis* (Joiner, 1997; Boschiroli *et al.*, 2002). Todos estos organismos residen en vacuolas en la célula huésped,

las que han restringido su fusión con vesículas de la cascada endocítica (lisosomas) y han comenzado interacciones con otros organelos celulares (Sinai y Joiner, 1997). En *L. pneumophila* y *C. burnetii* la expresión de los genes involucrados en el sistema Dot/Icm es el responsable de este evento (Segal *et al.*, 2005). En *B. suis* el inicio de la expresión de los genes del SSTIV requiere la acidificación del fagosoma, demostrándose que la neutralización del pH del fagosoma con Cloruro de Amonio o con ciertas drogas bloquea la expresión del SSTIV y por ende la replicación de la bacteria (Boschiroli *et al.*, 2002).

Con la finalidad de evaluar si una disminución de pH produce algún efecto en los niveles de expresión de los genes *dot/icm* en *P. salmonis*, se evaluó la expresión de éstos en cultivos líquidos a diferente pH utilizando qRT-PCR. En una primera instancia se evaluó la expresión de los genes *dot/icm* a pH neutro, con el propósito de determinar si existe expresión de estos genes durante el crecimiento en medio libre de células. Se obtuvo que a pH 7,0, los genes *dot/icm* se expresan constitutivamente en *P. salmonis*, ya que la cuantificación de la transcripción realizada por QRT-PCR mostró un alto número de copias del mensaje de los 4 genes (10^3 - 10^5) en esa condición (Figuras 42, 43, 44 y 45). A pesar de que en *Brucella suis* la expresión de los genes del SSTIV ocurre solamente en el interior de los macrófagos, en otros organismos del mismo género *Brucella* estos genes si se expresan en su estadio extracelular, es decir constitutivamente (Boschiroli *et al.*, 2002), lo que se correlaciona con el resultado presentado anteriormente. Posteriormente el efecto del pH ácido en la expresión de los genes *dot/icm* fue evaluado al incubar la bacteria por 2, 4, 6 y 12 horas a pH 4,0 y pH 5,5, usando como control la expresión de éstos a pH neutro los mismos tiempos de incubación. De esta experiencia se obtuvo como resultado que en ambos pH ácidos la expresión de los genes *dot/icm* fue significativamente mayor que a pH neutro, especialmente a las 2 horas post-incubación (Figuras 42, 43, 44 y 45). Además, a pH 4,0 el nivel de expresión fue mayor que a pH 5,5, superando incluso en 2 logaritmos al número de copias de mensaje obtenido en pH neutro a las dos horas de incubación. Como control general de la transcripción se utilizó la secuencia del ITS, cuyo número de copias estuvo en el rango de 10^8 durante toda la cinética de crecimiento a pH 5,5 y pH 7,0, pero a pH 4,0 la transcripción de ITS cayó al menos 1 logaritmo a partir de las 4 horas de crecimiento (Figura 46), lo que podría indicar que la transcripción en general en la bacteria decae en pH ácido, pero que la expresión de los genes *dot/icm* se ve favorecida en esta condición. Un fenómeno similar ha sido reportado en *B. suis*, en la cual un shock ácido a pH 4,0 por tres horas disminuye

considerablemente la síntesis proteica pero induce la transcripción de los genes del SSTIV (Lin y Ficht, 1995; Boschirolí et al., 2002).

Los datos obtenidos en este trabajo son consistentes con la idea de que los genes de secreción son inducidos a pH ácido, sugiriendo que la acidificación del fagosoma representaría un evento crucial para dirigir la expresión de los genes *dot/icm* durante la infección en *P. salmonis*, pudiendo ser estos genes los responsables de la multiplicación intracelular de la bacteria. Al aumentar la expresión de los genes del sistema de secreción Dot/Icm la bacteria lograría exportar efectores de virulencia, los que serían los responsables de interferir en el tráfico vesicular de la célula huésped e inhibir la fusión fagosoma-lisosoma, para luego generar una vacuola de replicación donde poder multiplicarse y diseminarse en el organismo y provocar la enfermedad, tal como ocurre en los patógenos *L. pneumophila* y *C. burnetii*, que han sido utilizados como referencia en este trabajo. Adicionalmente, ha sido reportado mediante microscopía confocal que la vacuola que contiene a *P. salmonis* durante la infección *in vitro* en tres líneas celulares (RTS11, Sf21 y CHSE-214) no se fusiona con los lisosomas al menos durante los 5 primeros días post-infección (Gómez *et al.*, Manuscrito en revisión en PLoS One), evidencia que corroboraría la hipótesis antes mencionada.

8.4 GENES FLAGELARES/SSTIII EN EL GENOMA DE *P. SALMONIS*

8.4.1. Presencia de genes flagelares en el genoma de *P. salmonis*

A pesar que *P. salmonis* ha sido caracterizada como una bacteria inmóvil (Mauel *et al.*, 2003), en este trabajo se han identificado varios genes relacionados con la biosíntesis flagelar. Los genes identificados incluyen desde chaperonas, genes de control motor (*motA*, *motB*), genes del aparato de exportación flagelar, genes del gancho y del filamento, como también genes reguladores de la expresión flagelar, incluyendo al factor sigma-28 (*fliA*).

Muchos organismos debido a su ciclo de vida intracelular han perdido la capacidad de producir un flagelo funcional (Toft y Fares, 2008). A la fecha no se ha reportado la presencia de flagelo funcional en *P. salmonis*, a pesar en este trabajo se han encontrado la mayoría de los genes involucrados en el aparato flagelar. Un ejemplo de organismo que ha perdido motilidad flagelar es *Burkholderia mallei*, que es inmóvil, a pesar que *B. pseudomallei* y *B. thailandensis* son móviles. La pérdida de flagelo en *B. mallei* es debido a la inserción de un

transposón en el gen *motB* perdiendo su marco de lectura (Nierman *et al.*, 2004). De manera similar, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Yersinia enterocolitica* son móviles, en cambio *Y. pestis* es inmóvil debido a que el gen del factor transcripcional FliD está truncado (Bliska *et al.*, 2006). Al parecer, de los genes flagelares encontrados en el genoma de *P. salmonis*, ninguno se encontraba truncado o con alguna secuencia de inserción que interrumpiera el correcto marco de lectura del gen, como ocurre en los ejemplos anteriores, pero aún falta por encontrar y caracterizar algunos otros genes para determinar que la bacteria tiene todo el set y de esa forma poder analizar cuál es el motivo de ser inmóvil a pesar de tener todos los genes relacionados con la motilidad.

Se puede señalar que al parecer los patógenos adaptados a la vida en el huésped han perdido motilidad y que tal vez la estructura flagelar no realice su función convencional, sino que podría ser requerida para la patogenicidad o adhesión, hipótesis que debería ser estudiada a futuro en *P. salmonis*. De hecho, existen varios ejemplos que relacionan a los genes flagelares con virulencia y no solamente con la motilidad, como es el caso de *Xenorhabdus nematophila* (patógeno de insectos y nemátodos) en que el factor sigma-28 flagelar (FliA), junto con la proteína reguladora FliZ están involucradas directamente en la expresión de genes relacionados con la producción de exoenzimas, motilidad y virulencia (Lanois *et al.*, 2008). Otro ejemplo clave es el caso de *P. aeruginosa*, donde se determinó el rol del flagelo en tiempos iniciales de una infección al tracto respiratorio, donde mutantes en el gen *fliC* no generó mortalidad en ratas, en comparación con 30% de mortalidades provocadas por la cepa tipo, ocurriendo algo similar con un mutante en el gen *pilA* (Feldman *et al.*, 1998).

Para el caso de los genes relacionados con el SSTIII, no se encontró algún homólogo a éstos en las secuencias del genoma de *P. salmonis*, como tampoco en el plásmido pPsal. En primera instancia, se pensó que algunos de los genes flagelares podrían haber estado relacionados con los del SSTIII, ya que se ha descrito que al menos 11 proteínas del SSTIII comparten homología con el aparato flagelar, indicando que estos dos organelos tienen un origen evolutivo común (Cornelis, 2002).

8.5 GENERACIÓN DE ORGANISMOS KNOCK OUT

Hace algunos años, la transformación y el diseño de sistemas de mutagénesis o para generar *Knock out* de genes en organismos patógenos ha adquirido una gran relevancia. A la fecha, en *P. salmonis* no existen avances en este ámbito, pero si en otros patógenos intracelulares, en los cuales se ha trabajado intensamente en la búsqueda de herramientas genéticas que permitan manipular a estos organismos. Los principales objetivos del desarrollo de estas estrategias de transformación y manipulación genética es de encontrar nuevas alternativas para la generación de vacunas más eficaces, y comprender de un mejor modo los mecanismos de patogenicidad y virulencia. Un punto importante de señalar corresponde a que se ha descrito que muchos organismos intracelulares no reconocen secuencias promotoras ni reguladoras típicas contenidas en los vectores de expresión tradicionales (vectores comerciales), como por ejemplo secuencia promotora del bacteriófago T7 que es ampliamente utilizado para la expresión de genes en *Escherichia coli* (Rodríguez *et al.*, 2009). Por este motivo, en la construcción de estos vectores se utilizan promotores propios de los patógenos, siendo el más utilizado el del operón *groES-groEL* (HSP10-HSP60), como también algunos promotores de genes de virulencia (Boschioli *et al.*, 2002). En este trabajo se buscaron regiones promotoras propias de la bacteria para la construcción de cassettes de expresión eficientes. Se lograron encontrar dos secuencias promotoras, con las técnicas utilizadas, la primera correspondió a la región promotora del operón *groES-ChaP.s*, utilizando la técnica de RAGE, y el segundo promotor fue el del operón toxina-antitoxina *vapBC*, mediante la secuenciación de una librería genómica de la bacteria (Gómez *et al.*, 2011). Se logró la construcción de un cassette de expresión con el promotor *groES-ChaP.s* usando como gen reportero a *cat* (Cloranfenico Acetil Transferada o gen de resistencia a Cloranfenicol).

A pesar de haber probado varias estrategias de transformación para el patógeno, desde biobalística hasta conjugación, no se pudo obtener transformantes con los vectores diseñados. Una posible razón es que las técnicas utilizadas para este propósito no han sido las indicadas, específicamente al generar las células competentes para la transformación, ya que posiblemente los tratamientos de competencia no han logrado producir la inestabilidad en la membrana de la bacteria para poder incorporar el ADN foráneo. Cabe mencionar que algunas bacterias marinas, como *Vibrio parahaemolyticus* ha sido difícil la transformación debido a que esta bacteria secreta nucleasas al periplasma lo que genera la degradación de los plásmidos transformantes (Hamashima *et al.*, 1990; Kawagishi *et al.*, 1994), tal vez por

ese motivo se debería probar algún nuevo protocolo que permita la eliminación de estas enzimas previo a la generación de las células competentes. Otro factor que podría estar interfiriendo en la transformación es que la bacteria no sea capaz de reconocer los orígenes de replicación de los vectores utilizados, por lo cual éstos tal vez ingresan a las células con las estrategias utilizadas, pero no son capaces de replicarse, por lo que no se pueden mantener.

A pesar de no haber encontrado una alternativa de transformación efectiva para *P. salmonis* en literatura existe una vasta información acerca de mecanismos de transformación genética de organismos cercanos filogenéticamente a ella, como es el caso de *L. pneumophila*, en el que su manipulación genética ha sido realizada desde hace más de un década. En este organismo se ha logrado inactivar genes generando mutantes no infectivos, además de producir la expresión de proteínas heterólogas (proteínas recombinantes). Entre los mayores logros alcanzados en este patógeno destacan el haber introducido un vector plasmidial modificado que permitió la expresión de proteínas de virulencia de la bacteria *Coxiella burnetii* con una alta eficiencia (Zamboni *et al.*, 2003). Los genes de *C. burnetii* expresados en *L. pneumophila* corresponden a los denominados genes *dot/icm*. En *L. pneumophila*, también se han establecido sistemas genéticos que permiten realizar mutagénesis por transposones en su genoma (Tn5, Tn903dIIIacZ, MudphoA), especialmente adaptados para lograr bloquear genes esenciales para la virulencia del patógeno, como también para identificar mutantes con baja capacidad de virulencia e incapaces de multiplicarse en el nicho intracelular (Ott, 1994). Existen varios reportes en que se ha logrado la delección de genes *dot/icm* en *L. pneumophila*, para entender el funcionamiento de este sistema de virulencia en el patógeno, como por ejemplo se ha determinado que mutantes nulos en el gen que codifica para la ATPasa DotB son incapaces de replicarse en el interior de macrófagos, lo que indicaría que esta proteína es absolutamente necesaria para la función del complejo Dot/Icm (Sexton *et al.*, 2004). En organismos rickettsiales existen importantes logros en este ámbito. La limitante antes existente por la naturaleza de intracelular obligado de estos organismos ha sido solucionado con nuevas estrategias que permiten la selección de las bacterias transformantes en los cultivos celulares hospederos. Dos especies de *Rickettsia* han sido exitosamente transformadas mediante electroporación (Wood y Azad, 2000). Rachek *et al.* (1998) demostró que es posible ingresar vectores plasmidiales vía electroporación en células del patógeno *Rickettsia prowazekii* y que además es factible que el material genético contenido en estos vectores se integre al

genoma por medio de recombinación homóloga. En *Rickettsia typhi* se ha demostrado la factibilidad de la transformación utilizando la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) para detectar las células recombinantes en las poblaciones bacterianas (Troyer *et al.*, 1999). Adicionalmente, los organismos *Anaplasma marginale* y *Anaplasma phagocytophilum* han logrado ser transformados por inserción de un sistema transposón/Transposasa con genes de resistencia a antibiótico (Felsheim *et al.*, 2010). Otros patógenos intracelulares como *Coxiella burnetii*, *Brucella suis*, *Chlamydia trachomatis* y *Mycobacterium tuberculosis* han sido modificados genéticamente con la finalidad de comprender la importancia de algunos genes en la virulencia y patogenicidad, como también para determinar su importancia en la infección. De esta misma forma, se han buscado alternativas que permitan el desarrollo de nuevas estrategias profilácticas (McQuiston *et al.*, 1995; Suhan, 1996; Binet and Maurelli, 2009).

La generación de organismos *Knock out* en organismos intracelulares tiene como su mayor ejemplo a la bacteria *F. tularensis*, que presenta una cercanía filogenética alta con *P. salmonis* (Gammaproteobacteria, Thiotrichales). Esta bacteria ha logrado ser transformado de manera eficiente en la última década. Mecanismos de intercambio alélico y transformación han sido descritos recientemente para la inactivación de genes en *F. tularensis* (Kawula *et al.*, 2004). Pero, a pesar de la exhaustiva investigación y avances existentes, los estudios de los mecanismos moleculares de la patogénesis de *F. tularensis*, se han visto obstaculizados por la falta de técnicas genéticas para una rápida interrupción génica en la mayoría de los subespecies virulentas (Rodríguez *et al.*, 2008). El desarrollo de rápidas y eficientes técnicas para la manipulación genética de *F. tularensis* es crítico para el desarrollo de vacunas eficientes contra la tularemia (Liu *et al.*, 2007). Hace algunos años atrás ya se había reportado la transformación plasmidial de este patógeno, pero en general el uso de estas herramientas era limitado debido a la baja integración del DNA plasmidial en el genoma y a una tasa relativamente baja de frecuencia de transformación (Maier *et al.*, 2004). En el año 2007 ha sido descrito un sistema mediante el cual se ha logrado generar mutagénesis dirigida en varias cepas de este patógeno de una manera exitosa, utilizando un sistema de intrones de grupo II ("Targetrons"). Mediante esta nueva herramienta se han inactivado genes importantes para la virulencia del patógeno, como por ejemplo, los genes *iglC*, *iglB* y otros genes encontrados en la Isla de patogenicidad (Liu *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2008). En este trabajo se utilizó el sistema TargeTron descrito para *F. tularensis*, a pesar de que no se pudo transformar la

bacteria, si se realizó un modelo de *Knock out* con este sistema, generando la inserción del intrón en el gen de ChaP.s pero clonado en el vector pBluescript SK+, usando *E. coli* como reservorio, mostrando ser exitoso, comprobando que el sistema funciona, a pesar de no poder haber sido probado directamente en el genoma de *P. salmonis*, pero si en un gen de la bacteria.

9. CONCLUSIONES

Este trabajo tuvo como objetivo principal obtener un mejor entendimiento del comportamiento de la bacteria patógena *Piscirickettsia salmonis* durante la infección, en especial conocer cuáles son los mecanismos que utiliza este organismo para evadir el sistema inmune y provocar la enfermedad. Por ese motivo se realizó la búsqueda de genes que tuvieran relación con la virulencia y patogenicidad de la bacteria, en especial genes relacionados con los sistemas de secreción en Gram-negativas ya que, en general, éstos permiten la exportación o secreción de factores de virulencia, moléculas capaces de afectar el comportamiento de la célula huésped a favor del patógeno.

Es así que se realizó la búsqueda de los seis sistemas de secreción descritos en bacterias en el genoma de *P. salmonis*, ya que se ha descrito que algunas bacterias pueden tener hasta 5 sistemas de secreción funcionales codificados en su genoma.

Se verificó que *P. salmonis* contiene en su genoma al menos dos sistemas de secreción, que corresponden a SSTI y SSTIV (Dot/Icm), además de los genes del Pili Tipo IV (homólogo al SSTII).

Se comprobó que ambos sistemas de secreción están transcripcionalmente activos en diferentes condiciones de crecimiento de la bacteria, por lo que se descarta que sean genes vestigiales o no funcionales.

La expresión de los genes estructurales del SSTIV Dot/Icm es regulada por un cambio de pH, siendo el medio ácido el que produce una sobreexpresión de ellos, lo que indicaría que la fusión fagosoma-lisosoma es el gatillante para la secreción de efectores de virulencia por esta vía en *P. salmonis*.

Se descarta en *P. salmonis* la existencia de los sistemas de secreción SSTII, SSTV y SSTVI

Se evidenció que *P. salmonis* contaría con otros sistemas implicados en virulencia, como el sistema Pili Tipo IV y genes flagelares.

A pesar que *P. salmonis* es caracterizada como inmóvil, la presencia del set de genes implicados en la biosíntesis flagelar en su genoma podría cambiar ese paradigma y, adicionalmente, estos genes podrían tener una implicancia en la virulencia del patógeno. Aunque la bacteria está descrita como inmóvil, no se puede descartar que exista la expresión de los genes flagelares, sabiendo que la expresión de estos está regulada por una cascada compleja en la que están presentes proteínas reguladoras y varios factores sigma, por lo que habría en cuál de las etapas de la cascada está el problema para no haber una estructura flagelar, estando presentes los genes.

La presencia de genes estructurales del Pili Tipo IV en el genoma de *P. salmonis* indica que el patógeno contiene las herramientas típicas presentes en bacteria que están involucradas en adherencia y formación de biofilm.

Con los resultados obtenidos tras la consecución de los primeros tres objetivos de esta tesis se puede señalar que el sistema de secreción Dot/Icm sería el responsable de la multiplicación intracelular y la evasión del sistema inmune en *P. salmonis*, tal como lo es en otros organismos relacionados, como son *L. pneumophila* y *C. burnetii*. Posicionándolo como el mayor mecanismo de virulencia de la bacteria.

Adicionalmente el SSTI exporta una α -hemolisina, la que estaría implicada en la lisis celular que la bacteria genera durante la infección, como también en la captación de hierro disponible para sus funciones metabólicas. El conocimiento de los mecanismos de virulencia de la bacteria permitirán el desarrollo de nuevas alternativas profilácticas para el control de la enfermedad, utilizando como blanco estos genes o interferir en algún proceso de bacteriano realizado por alguno de estos sistemas.

Se encontró la presencia de un operón toxina-antitoxina en el genoma de *P. salmonis* (*vapBC*), el que tiene las mismas características de sus homólogos en otros organismos. Adicionalmente, se logró determinar la región promotora de este operón bicistrónico, el que reúne las características típicas de un promotor bacteriano.

Utilizando la técnica de RAGE se encontró el gen de la proteína HSP10 (GroES) y asimismo la región promotora de éste, pudiendo comprobar que este gen forma un operón bicistrónico en conjunto con el gen de la proteína ChaP.s.

En el último objetivo de este trabajo se logró realizar un *knock out* de un gen de *P. salmonis* (ChaP.s), clonado en *E. coli*, validando de esta forma al sistema de mutagénesis dirigida TargeTron™, el que había sido descrito para otros organismos. A pesar de no haber cumplido este último objetivo a cabalidad, debido a no se logró optimizar la transformación de la bacteria, la mayor proyección de este trabajo es la generación de una cepa no virulenta y no infectiva por medio de *Knock out* genes. Esta cepa tendría la potencialidad de ser utilizada como una vacuna viva teniendo una ventaja superior a las bacterinas contra SRS disponibles en el mercado, debido a: su capacidad de inducir una respuesta inmune por sí mismas, que pueden imitar una infección natural (capaces de ingresar a las células sin provocar la enfermedad activando el sistema inmune), que presentan propiedades intrínsecas de adyuvantes y tienen la potencialidad de ser administradas por vía oral, lo que las transforma en una alternativa de vacunación bastante atractiva.

10. RECOMENDACIONES:

- La información entregada en este trabajo acerca de los mecanismos de patogenicidad de la bacteria tiene la potencialidad de ser utilizado como base para el desarrollo de nuevas alternativas para la prevención y control de la Picirickettsiosis.
- Se recomienda en futuros trabajo la búsqueda del completo el set de genes que codifican para el aparato estructural del sistema de secreción Dot/Icm, así como también de los SSTI y Pli tipo IV con la finalidad de comprobar que todos los genes están presentes en el genoma de *P. salmonis*, y de esta forma, hacer un mayor análisis de funcionalidad de éstos.
- Con respecto a los genes flagelares, se recomienda hacer un análisis completo de los niveles de expresión de todas las clases involucradas en la biosíntesis flagelar, para lograr un mayor entendimiento de la real función de este sistema en la bacteria. Además se recomienda una análisis funcional de las secuencias promotoras de todos los genes flagelares, con la finalidad de determinar si la no existencia de un flagelo funcional en la bacteria es debido a una regulación provocada por la no funcionalidad de los promotores.
- En todos los casos un análisis proteómico sería necesario para determinar la presencia de las proteínas codificadas por los genes descritos en este trabajo, utilizando anticuerpos específicos, comprobando de esta forma que los genes son todos funcionales. Además este análisis permitiría una caracterización integral de todos los sistemas de secreción, englobando caracterización genética y proteómica.
- Para lograr una transformación eficiente de la bacteria, se recomienda la construcción de una vector que contenga el origen de replicación del plásmido criptico de *P. salmonis*, para de ésta forma asegurar su replicación y permanencia en el tiempo.
- Una vez lograda la transformación eficiente, el es posible generar el *Knock out* de los genes de virulencia. una vez obtenida esta cepa mutante se deberá evaluar su infectividad. Si se logra la obtención de una cepa no infectiva por esta vía, esta tendrá la potencialidad de ser utilizada como un modelo de vacuna viva, que podría entregar un mejor grado de protección que las vunas existentes en el mercado en la actualidad.

11. REFERENCIAS:

1. **Abdallah A. M., Gey van Pittius N. C., Champion P. A., Cox J., Luirink J., Vandebroucke-Grauls C. MAppelmelk., B. J. and Bitter W.;** Type VII secretion-mycobacteria show the way. *Nat. Rev. Microbiol.* 2007, 5:883–891.
2. **Actis L. A., Tolmasky M. E. and Crosa J. H.;** Vibriosis in: Woo PTK, Bruno D. W. (eds); *Fish diseases and disorders.* U.K. 1999, P.p. 523-557.
3. **Akpe San Roman S., Facey P. D., Fernandez-Martinez L., Rodriguez C., Vallin C., Del Sol R. and Dyson P.;** A heterodimer of EsxA and EsxB is involved in sporulation and is secreted by a type VII secretion system in *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology* 2010, 156:1719–1729
4. **Almendras F. F., Jones S. R. M., Fuentealba C., Wrigth G. M.;** *In vitro* infection of a cell line from *Ictalurus nebulosus* with *Piscirickettsia salmonis*; *Can. J. Vet. Res.*, 1997, 61: 66-68.
5. **Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. and Lipman D. J.;** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs; *Nucleic Acids Res.* 1997 25(17):3389-402.
6. **Aly K. A, Krall L., Lottspeich F. and Baron C.;** The Type IV Secretion System Component VirB5 Binds to the *trans*-Zeaxin Biosynthetic Enzyme Tzs and Enables Its Translocation to the Cell Surface of *Agrobacterium tumefaciens*; *Journal of Bacteriology*, Mar. 2008, p. 1595–1604.
7. **Anderson D. M. and Schneewind O.;** A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*; *Science* 1997, 278(5340):1140-3.
8. **Andreas K. J., Veenendaal J., Hodgkinson L., Schwarzer L., Stabat D., Zenk S. and Blocker J;** The type III secretion system needle tip complex mediates host cell sensing and translocon insertion; *Mol. Microbiol.* 2007, 63(6), 1719–1730.

9. **Andrews H. L., Vogel J. P. and Isberg R. R.;** Identification of linked *Legionella pneumophila* genes essential for intracellular growth and evasion of the endocytic pathway; *Infect. Immun.* 1998, 66: 950–958.
10. **Andrzejewska J., Lee S. K., Olbermann P., Lotzing N., Katzowitsch E., Linz B., Achtman M., Kado C. I., Suerbaum S. and Josenhans C.;** Characterization of the pilin ortholog of the *Helicobacter pylori* type IV cag pathogenicity apparatus, a surface-associated protein expressed during infection.; *J. Bacteriol.* 2006, 188(16): 5865-77.
11. **Arkush K. D, McBride A. M., Mendonca H. L. , Okihiro M., Andree K. B., Marshall S.H., Henríquez V. and Hedrick R. P.;** Genetic characterization and experimental pathogenesis of *Piscirickettsia salmonis* isolated from white seabass *Atractoscion nobilis*. *Dis. Aquat. Organ.* 2005, 63 (2-3):139-49.
12. **Athanassopoulou F., Groman D., Prapas Th. and Sabatakou, O.;** Pathological and epidemiological observations on rickettsiosis in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) from Greece; *Journal of Applied Ichthyology*, 2004 20 (6): 525-529.
13. **Aziz R. K., Bartels D., Best A. A., DeJongh M., Disz T., Edwards R. A., Formsma K., Gerdes S., Glass E. M., Kubal M., Meyer F., Olsen G. J., Olson R., Osterman A. L., Overbeek R. A., McNeil L. K., Paarmann D., Paczian T., Parrello B., Pusch G. D., Reich C., Stevens R., Vassieva O., Vonstein V., Wilke A. and Zagnitko O.;** The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology; *BMC Genomics.* 2008, 9:75.
14. **Bader J. A., Shoemaker C. A. and Klesius P. H.;** Rapid detection of columnaris disease in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) with a new species-specific 16-S rRNA gene-based PCR primer for *Flavobacterium columnare*; *J. Microbiol. Methods.* 2003, 52(2):209-20.
15. **Balcázar J. L., Vendrell D., de Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Girones O. and Muzquiz J. L.;** Quantitative detection of *Aeromonas salmonicida* in fish tissue by real-time PCR using self-quenched, fluorogenic primers; *J. Med. Microbiol.* 2007, 56: 323-328.
16. **Barker J. R., Chong A., Wehrly T. D., Yu J. J., Rodriguez S. A., Liu J., Celli J., Arulanandam B. P., Klose K. E.;** The *Francisella tularensis* pathogenicity island encodes

- a secretion system that is required for phagosome escape and virulence; *Mol. Microbiol.* 2009, 74(6):1459-70.
17. **Baron C., O'Callaghan D. and Lanka D.;** Bacterial secrets of secretion: Euro Conference on the biology of type IV secretion processes; *Mol. Microbiol.* 2002: 43, 1359–1365.
 18. **Betts H. J., Chaudhuri R. R. and Pallen M. J.;** An analysis of type-III secretion gene clusters in *Chromobacterium violaceum*; *Trends Microbiol.* 2004, 12(11):476-82.
 19. **Bhakdi S., Mackman N., Nicaud J. M. and Holland I. B.;** *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores; *Infect. Immun.* 1986, 52(1): 63-69.
 20. **Binet R., Létoffé S., Ghigo J. M., Delepelaire P. and Wandersman C.;** Protein secretion by Gram negative bacterial ABC exporters – a review; *Gene*, 1997, 192:7-11.
 21. **Binet R. and Maurelli A. T.;** Transformation and isolation of allelic exchange mutants of *Chlamydia psittaci* using recombinant DNA introduced by electroporation; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2009, 106(1):292-297.
 22. **Bingle L. E. H., Bailey C. M. and Pallen M. J.;** "Type VI secretion: a beginner's guide". *Curr. Opin. Microbiol.* 2008, 11 (1): 3–8.
 23. **Birkbeck T. H., Bordevik M., Frøystad M. K. and Baklien A.;** Identification of *Francisella sp.* from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Chile; *Journal of Fish Diseases*, 2007, 30, 505–507.
 24. **Birkbeck T. H., Griffen A. A., Reid H. I., Laidler L. A. and Wadsworth S.;** Growth of *Piscirickettsia salmonis* to high titers in insect tissue culture cells; *Infect Immun* 2004 72(6):3693-4.
 25. **Bliska J. B., Ryndak M. B. and Grabenstein J. P.;** Type III Secretion Systems in *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. In *Bacterial Genomes and Infectious*

Diseases Edited by: Chan V. L., Sherman P. M., Bourke B. Totowa, New Jersey: Humana Press 2006, 213-226.

26. **Blocker A., Gounon P., Larquet E., Niebuhr K., Cabaix V., Parsot C. and Sansonetti P.**; The tripartite type III secretin of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes; *J. Cell Biol.* 1999, 147: 683–693.
27. **Blocker A., Jouihri N., Larquet E., Gounon P., Ebel F., Parsot C., Sansonetti P. and Allaoui A.**; Structure and composition of the *Shigella flexneri* “needle complex”, a part of its type III secretin; *Mol. Microbiol.* 2001, 39: 652–663.
28. **Bohle H., Kjetil F., Bustos P., Riofrío A. and Peters C.**; Atypical phenotype of *Vibrio ordalii*, a highly pathogenic bacteria isolated from Atlantic salmon reared on the marine coast of southern Chile; *Arch. Med. Vet.* 2007, 39 (1).
29. **Bohle H., Tapia E., Martínez A., Rozas M., Figueroa A. and Bustos P.**; *Francisella philomiragia*, bacteria asociada con altas mortalidades en salmones del Atlántico (*Salmo salar*) cultivados en balsas-jaulas en el lago Llanquihue; *Arch. Med. Vet.* 2009, 41: 237-244.
30. **Branson E.J. and Diaz-Munoz D.N.**; Description of a new disease condition occurring in farmed Coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), in South America; *J. Fish. Dis.* 1991;14:147–56.
31. **Bravo S. y Campos M.**; Síndrome del salmón Coho; *Chile Pesquero*, 1989 54: 47-48.
32. **Bravo S. and Midtlyng P. J.**; The use of fish vaccines in the Chilean salmon industry 1999-2003. *Aquaculture* 2007, 270: 36-42.
33. **Boschiroli M. L., Ouahrani-Bettache S., Foulongne V., Michaux-Charachon S., Bourg G., Allardet-Servent A., Cazevieille C., Liautard J. P., Ramuz M. and O'Callaghan D.**; The *Brucella suis virB* operon is induced intracellularly in macrophages; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002, 99(3): 1544-9.

34. **Buchanan S. K.**; Type I secretion and multidrug efflux: transport through the TolC channel tunnel; Trends Biochem. Sci., 2001 26:3-6.
35. **Burr S. E., Stuber K., Wahli T. and Frey J.**; Evidence for a type III secretion system in *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida*; J. Bacteriol. 2002, 184(21): 5966-70.
36. **Burts M. L. and Missiakas D.**; EsaC substrate for the ESAT-6 secretion pathway and its role in persistent infections of *Staphylococcus aureus* Mol. Microbiol. 2008, 69:736–746.
37. **Burts M. L., Williams W. A., DeBord K., Missiakis D. M.**; EsxA and EsxB are secreted by an ESAT-6-like system that is required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 2005, 102:1169–1174.
38. **Bustos A.**; Los salmones movilizan al país; Biblioteca del Congreso Nacional de Chile, 2008 (disponible *on line* en: <http://www.bcn.cl/de-que-se-habla/los-salmones-movilizan-al-pais-2>).
39. **Büttner D. and Bonas U.**; Port of entry—the type III secretion translocon; TRENDS in Microbiol. 2002, 10 (4).
40. **Carle A., Höppner C., Ahmed Aly K., Yuan Q., den Dulk-Ras A., Vergunst A., O'Callaghan D. and Baron C.**; The *Brucella suis* type IV secretion system assembles in the cell envelope of the heterologous host *Agrobacterium tumefaciens* and increases IncQ plasmid pLS1 recipient competence Infect Immun. 2006, 74(1): 108-17.
41. **Celli, J., C. de Chastellier, D. M. Franchini, J. Pizarro-Cerda, E. Moreno, and J. P. Gorvel.**; *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. J. Exp. Med. 2003, 198:545–556.
42. **Cerdeña-Tarraga A. M., Efstratiou A., Dover L. G, Holden M. T. G., Pallen M., Bentley S. D., Besra G. S., Churcher C., James K. D., De Zoysa A., Chillingworth T., Cronin A., Dowd L., Feltwell T., Hamlin N., Holroyd S., Jagels K., Moule S., Quail M. A., Rabinowitsch E., Rutherford K. M., Thomson N. R., Unwin L., Whitehead S., Barrell B. G. and Parkhill J.**; The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129; Nucleic Acids Research, 2003, Vol. 31, No. 22.

43. **Chakraborty S., Monfett M., Maier T. M., Benach J. L., Frank D. W. and Thanassi D. G.;** Type IV pili in *Francisella tularensis*: roles of pilF and pilT in fiber assembly, host cell adherence and virulence; *Infect. Immun.* 2008, 76(7): 2852-61.
44. **Chen Y., McClane B. A., Fisher D. J., Rood J. I. and Gupta P.;** Construction of an Alpha Toxin gene *Knock out* mutant of *Clostridium perfringens* type A by use of a mobile group intrón II; *Appl. Env. Microbiol.* 2005, 71: 7542-7547.
45. **Cheng Z., Wang X. and Rikihisa Y.;** Regulation of type IV secretion apparatus genes during *Ehrlichia chaffeensis* intracellular development by a previously unidentified protein; *J. Bacteriol.* 2008, 190(6): 2096-105.
46. **Christie, P. J.;** Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines; *Mol. Microbiol.* 2001, 40, 294–305.
47. **Christie P. J., Atmakuri K., Krishnamoorthy V., Jakubowski S. and Cascales E.;** Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems; *Annu. Rev. Microbiol.* 2005, 59:451-85.
48. **Christie P. J. and Vogel J. P.;** Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells; *Trends Microbiol.* 2000 8:354-360.
49. **Cianciotto N.P.;** Type II secretion: a protein secretion system for all seasons; *Trends in Microbiology* 2005, 13(12):581-588.
50. **Clamp M., Cuff J., Searle S. M. and Barton G. J.** The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics* 2004 20: 426-427.
51. **Conover G. M., Derré I., Vogel J. P. and Isberg R. R.;** The *Legionella pneumophila* LidA protein: a translocated substrate of the Dot/Icm system associated with maintenance of bacterial integrity; *Mol. Microbiol.* 2003, 48(2): 305-21.

52. **Cordes, F. S., Komoriya, K., Larquet, E., Yang, S., Egelman, E. H., Blocker, A., and Lea, S. M.**; Helical structure of the needle of the type III secretion system of *Shigella flexneri*. *J. Biol. Chem.* 2003, 278: 17103–17107.
53. **Cornelis G. R.**; The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry; *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002, 3(10):742-52.
54. **Correal P.**; Prospección de *P. salmonis* en forma marina silvestre asociada al cultivo interno de salmónidos. Tesis (Médico veterinario); Universidad de Chile, facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, 1995.
55. **Costa J., Tiago I., Da Costa M. S. and Veríssimo A.**; Molecular evolution of *Legionella pneumophila dotA* gene, the contribution of natural environmental strains; *Environ. Microbiol.* 2010, 12(10):2711-29.
56. **Cottet L., Rivas-Aravena A., Cortez-San Martin M., Sandino A. M., Spencer E.**; Infectious salmon anemia virus--genetics and pathogenesis. *Virus Res.*, 2011 155(1):10-9.
57. **Craig L. and Li J.**; Type IV pili: paradoxes in form and function; *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2008, 18(2): 267-277.
58. **Cvitanich J. D., Garate N. O. and Smith C. E.**; Etiological agent in Chilean Coho disease isolated and confirmed by Koch's postulates. *American Fisheries Society Fish Health Section Newsletter.* 1990, 18 (1): 1-2.
59. **De Buck E., Anné J. and Lammertyn E.**; The role of protein secretion systems in the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*; *Microbiology* 2007, 153(12): 3948-53.
60. **Dehio C.**; Infection-associated type IV secretion systems of *Bartonella* and their diverse roles in host cell interaction; *Cell Microbiol.* 2008, 10(8):1591-8.
61. **Delepelaire P.**; Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004, 1694(1–3):149-161.

62. **Driessen A. J., Manting E. H. and Van der Does C.;** The structural basis of protein targeting and translocation in bacteria; *Nat. Struct. Biol.* 2001, 8:492-498.
63. **Feldman M., Bryan R., Rajan S., Scheffler L., Brunnert S., Tang H. and Prince A.;** Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection; *Infect. Immun.* 1998, 66(1):43-51.
64. **Felsheim R. F., Chávez A. S., Palmer G. H., Crosby L., Barbet A. F, Kurtti T. J. and Munderloh U. G.;** Transformation of *Anaplasma marginale*; *Veterinary Parasitology*, 2012, 167(2-4):167-74.
65. **Flores Herrera O., Riveros Rosas H., Sosa Peinado A. y Vázquez Contreras E.;** Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias Gram negativas: biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia; *Mensaje Bioquímico*, 2003 Vol XXVII.
66. **Filloux A.;** The underlying mechanisms of type II protein secretion: *Biochimica et Biophysica Acta* 2004, 1694(1-3):163-179.
67. **Finlay B. B. and Falkow S.;** Common themes in microbial pathogenicity revisited; *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 1997, 61(2):136-69.
68. **Frazier C. L., San Filippo J., Lambowitz A. M. and Mills D. A.;** Genetic manipulation of *Lactococcus lactis* by using targeted Group II Introns: generation an stable insertions without selection; *Appl. Env. Microbiol.* 2003, 69: 1121-1128.
69. **Fryer J. L. and Hedrick R. P.;** *Piscirickettsia salmonis*: a Gram-negative intracellular bacterial pathogen of fish; *Journal of Fish Diseases* 2003, 26: 251-262.
70. **Fryer J. L. and Mael M. J.;** The Rickettsia: an emerging group of pathogens in fish; *Emerg. Infect. Dis.* 1997, 3:137-44.
71. **Fryer J. L., Lannan C. N., Garcés H. L, Larenas J. L. and Smith P. A.;** Isolation of Rickettsiales-like organism from diseased coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile; *Fish Pathology*, 1990, 25 (2): 107-114.

72. **Fryer J. L., Lannan C. N., Giovannoni S and Wood N.**; *Piscirickettsia salmonis* gen. nov., sp. Nov., The causative Agent of Epizootic Disease in Salmonid Fishes; International Journal of Systematic Bacteriology, 1992, 42: 120-126.
73. **Gaggero A., Castro H., and Sandino A. M.**; First isolation of *Piscirickettsia salmonis* from Coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), during the freshwater stage of their life cycle. J. Fish. Dis. 1995, 18: 277–279.
74. **Galan J. E. and Bliska J. B.**; Cross-talk between bacterial pathogens and their host cells. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 1996, 12:221-255.
75. **Galán J. E. and Collmer A.**; Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells; Science 1999, 284: 1322-1328.
76. **Ganassin R. C. and Bols N. C.**; Development of a monocyte/macrophage-like cell line, RTS11, from rainbow trout spleen; Fish & Shellfish Immunology 1998, 8: 457–476.
77. **Gangwar D., Kalita M. K., Gupta D., Chauhan V. S. and Mohammed A.**; A systematic classification of *Plasmodium falciparum* P-loop NTPases: structural and functional correlation. Malar J. 2008, 18:69.
78. **Garcés L. H., Larenas J. J., Smith P. A., Sandino S., Lannan C. N. and Fryer J. L.**; Infectivity of a rickettsia isolated from coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Dis. Aquatic Organ. 1991, 11: 93–97.
79. **Garufi G., Butler E. and Missiakas D.**; ESAT-6-Like protein secretion in *Bacillus anthracis*; J. Bacteriol. 2008, 190:7004–7011.
80. **Gentschev I., Dietrich G. and Goebel W.**; The *E. coli* alpha-hemolysin secretion system and its use in vaccine development; Trends Microbiol. 2002, 10(1): 39-45.
81. **Gey Van Pittius N. C., Gamielien J., Hide W., Brown G. D., Siezen R. J. and Beyers A. D.**; The ESAT-6 gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* and other high G+C Gram-positive bacteria; Genome Biol. 2001, 2(10):RESEARCH0044.

82. **Ghigo J. M. and Wandersman C.**; A carboxyl-terminal four-amino acid motif is required for secretion of the metalloprotease PrtG through the *Erwinia chrysanthemi* protease secretion pathway; J. Biol. Chem. 1994, 269(12):8979-85.
83. **Giron J. A., Torres A. G., Freer E. and Kaper J. B.**; The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. Mol. Microbiol. 2002, 44:361-379.
84. **Goebel W., Dietrich G. and Gentschev I.**; The *E. coli* α -hemolysin secretion system and its use in vaccine development. Trends Microbiol. 2002, 10: 39-45.
85. **Gómez F. A., Cárdenas C., Henríquez V. and Marshall S. H.**; Characterization of a functional toxin/anti-toxin module in the genome of the fish pathogen *Piscirickettsia salmonis*. FEMS Microbiol. Lett. 2011, 317: 83-92.
86. **Gómez F., Henríquez V. and Marshall S. H.**; Additional evidence of the facultative intracellular nature of the fish bacterial pathogen *Piscirickettsia salmonis*; Arch. Med. Vet. 2009, 41: 261-267.
87. **Gómez F. A., Tobar J. A., Henríquez V., Sola M. and Marshall S. H.**; Evidence of the presence of a functional Dot/Icm Type IV-B Secretion System in the fish bacterial pathogen *Piscirickettsia salmonis*; Manuscrito en Revisión en PloS One, 2012.
88. **Gophna U., Ron E. Z. and Graur D.**; Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events; Gene 2003, 312: 151–163.
89. **Graggero A., Castro H. and Sandino A. M.**; Fish isolation of *Piscirickettsia salmonis* from coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), during the freshwater stage on their life cycle. J. Fish. Dis. 1995, 18:277–9.
90. **Grosdent N., Maridonneau-Parini I., Sory M. P. and Cornelis G. R.**; Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis; Infect Immun. 2002, 70(8): 4165-76.

91. **Gutiérrez C. L., Gimpel J., Escobar C., Marshall S. H. and Henríquez V.**; Chloroplast genetic tool for the green microalgae *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, volvocales); *Journal Phycol.* 2012, 48: 976-983.
92. **Hamashima H., Nakano T., Tamura S. and Arai T.**; Genetic transformation of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, and *Vibrio cholerae* non O-1 with plasmid DNA by electroporation; *Microbiol. Immunol.* 1990, 34(8):703-8.
93. **Henríquez V.**; Identification des sequences chloroplastiques de deux microalgues marines: construction de vecteurs d'expression genetique specifiques; Tesis para optar al Grado de Dr. En Biología Molecular, 2006; Ecole Pratique des Hautes Etudes – Francia.
94. **Henríquez V., Rojas M. V. and Marshall S. H.**; An alternative efficient procedure for purification of the obligate intracellular fish bacterial pathogen *Piscirickettsia salmonis*; *App. Env. Microbiol.* 2003, 69: 6268-6271.
95. **Hirano T., Yamaguchi S., Oosawa K. and Aizawa S.**; Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*; *J. Bacteriol.* 1994, 176(17): 5439–5449.
96. **Honma Y., Fernández R. E. and Maurelli A. T.**; A DNA adenine methylase mutant of *Shigella flexneri* shows no significant attenuation of virulence; *Microbiology* 2004, 150: 1073–1078.
97. **Hood R. D., Singh P., Hsu F., Güvener T., Carl M. A., Trinidad R. R., Silverman J. M., Ohlson B. B., Hicks K. G., Plemel R. L., Li M., Schwarz S., Wang W. Y., Merz A. J., Goodlett D. R. and Mougous J. D.**; A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Cell Host Microbe* 2010, 7:25-37.
98. **House M. L. & Fryer J. L.**; The biology and molecular detection of *Piscirickettsia salmonis*; *Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases*, 2002, pp 141–155. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

99. **Hubbard P. A., Padovani D., Labunska T., Mahlstedt S. A., Banerjee R. and Drennan C. L.**; Crystal structure and mutagenesis of the metallochaperone MeaB: insight into the causes of methylmalonic aciduria; *J Biol. Chem.* 2007, 282(43): 31308-16.
100. **Heusipp G., Fälker S. and Schmidt M. A.**; DNA adenine methylation and bacterial pathogenesis; *Int. J. Med. Microbiol.* 2007, 297(1): 1-7.
101. **Hueck C. J.**; Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998, 62:379-433.
102. Informe Sectorial de Pesca y Acuicultura 2011 (www.subpesca.cl).
103. **Jennings M.E., Quick L. N., Ubol N., Shrom S., Dollahon N. and Wilson J. W.**; Characterization of *Salmonella* Type III Secretion Hyper-Activity Which Results in Biofilm-Like Cell Aggregation; *PLoS One* 2012, 7(3):e33080.
104. **Joiner K. A.**; Membrane-protein traffic in pathogen-infected cells; *J. Clin. Invest.* 1997, 99: 1814-1817.
105. **Jones K. M. Lloret J. Daniele J. R and Walker G. C.**; The Type IV Secretion System of *Sinorhizobium meliloti* Strain 1021 Is Required for Conjugation but Not for Intracellular Symbiosis; *Journal of Bacteriology*, Mar. 2007, p. 2133–2138
106. **Journet L., Agrain C., Broz P., and Cornelis G. R.**; The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler; *Science*, 2003 302: 1757–1760.
107. **Julio S. M., Heithoff D. M., Provenzano DKlose., K. K., Sinsheimer R. L., Low D. A. and Mahan M. J.**; DNA adenine methylase is essential for viability and plays a role in the pathogenesis of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Vibrio cholerae*; *Infect. Immun.* 2001, 69: 7610-7615.
108. **Juhas M., Crook D. W., Dimopoulou I. D., Lunter G., Harding R. M., Ferguson D. J. P. and Hood D.**; Novel Type IV Secretion System Involved in Propagation of Genomic Islands; *Journal of Bacteriology*, Feb 2007; 189: 761 - 771.

109. **Kawagishi I., Okunishi I., Homma M. and Ima Y.**; Removal of the periplasmic DNase before electroporation enhances efficiency of transformation in the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. *Microbiology* 1994, 140:2355-2361.
110. **Kawula T. H., Hall J. D., Fuller J. R., and Craven R. R.**; Use of transposon-transposase complexes to create stable insertion mutant strains of *Francisella tularensis* LVS; *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70(11):6901-4.
111. **Koster M., Bitter W. and Tommassen J.**; Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria; *Int. J. Med. Microbiol.*, 2000, 290: 325-331.
112. **Kibenge F. S. B., Kibenge M. J. T., Groman D. and McGeachy S.**; In vivo correlates of infectious salmon anemia virus pathogenesis in fish; *Journal of General Virology*, 2006 87 (9): 2645-2652.
113. **Kubori T., Sukhan A., Aizawa S. I. and Galán J.E.**; Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system; *Proc. Nat. Ac. Sci. U.S.A.* 2000. 97(18): 10225-10230.
114. **Kuzyk M. A., Thornton J. C. and Kay W. W.**; Antigenic characterization of the salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis*; *Infect. Immun.* 1996, 64: 5205 - 5210.
115. **Kuzyk M. A., Burian J., Thornton J. C. and Kay W. W.**; OspA, a lipoprotein antigen of the obligate intracellular bacterial pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2001, 3(1):83-93.
116. **Lannan C. and Fryer J. L.**; Extracellular survival of *Piscirickettsia salmonis*; *J. Fish Dis.* 1994, 17: 545-548.
117. **Lannan C. N., Bartholomew J. L. and Fryer J. L.**; Rickettsial and chlamydial infections in fish; *Fish Diseases and Disorders, Viral, Bacterial and Fungal Infections*, 1999. (3): 245–267. CAB International, Wallingford, UK.

118. **Lanois A., Jubelin G. and Givaudan A.**; FliZ, a flagellar regulator, is at the crossroads between motility, haemolysin expression and virulence in the insect pathogenic bacterium *Xenorhabdus*; *Mol. Microbiol.* 2008, 68(2): 516-533.
119. **Larenas J. J., Bartholomew J., Troncoso O., Fernández S., Ledezma H., Sandoval N., Vera P., Contreras J., Smith P.**; Experimental vertical transmission of *Piscirickettsia salmonis* and *in vitro* study of attachment and mode of entrance into the fish ovum; *Dis. Aquat. Organ.* 2003, 56(1):25-30.
120. **Larenas J.J., J. Contreras, S. Oyanedel, M.A. Morales, P. Smith**; Effect of loading density and temperature on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) inoculated with *Piscirickettsia salmonis*; *Arch. Med. Vet.* 1997, v.29 n.1.
121. **Larenas J, Astorga C, Contreras J, Smith P.** Detección de *Piscirickettsia salmonis* en ovas fertilizadas provenientes de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) experimentalmente infectadas. *Arch. Med. Vet.* 1996, 28: 161-166.
122. **Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J. and Higgins D. G.**; ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 2007 23: 2947-2948.
123. **Lee P. A., Tullman-Ercek D. and Georgiou G.**; The bacterial twin-arginine translocation pathway; *Annu. Rev. Microbiol.* 2006, 60: 373–395
124. **Lee V.T. and Schneewind O.**; Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections; *Genes and Develop*, 2001, 15:1725-1752.
125. **Lin J. and Ficht T. A.**; Protein synthesis in *Brucella abortus* induced during macrophage infection; *Infect. Immun.* 1995; 63: 1409-1414.
126. **Liu J., Zogaj X., Barker J. R. and Klose K. E.**; Construction of targeted insertion mutations in *Francisella tularensis* subsp. *Novicida*; *Biotechniques* 2007, 43(4):487-490.

127. **Lloyd S. A., Sjöström M., Andersson S. and Wolf-Watz H.**; Molecular characterization of the type III secretion signals via analysis of synthetic N-terminal amino acid sequences; *Mol Microbiol.* 2002, 43:51-59.
128. **Low D. A., Weyand N. J. and Mahan M. J.**; Roles of DNA Adenine Methylation in Regulating Bacterial Gene Expression and Virulence; *Infection and Immunity*, 2001, p. 7197–7204.
129. **Lycklama A., Nijeholt J. A. and Driessen A. J.**; The bacterial Sec-translocase: structure and mechanism; *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2012, 367(1592):1016-28.
130. **McCarthy U. M., Bron J. E., Brown L., Pourahmad F., Bricknell I. R., Thompson K. D., Adams, A. and Ellis A. E.**; Survival and replication of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout head kidney macrophages. *Fish Shellfish Immunol.* 2008, 25(5):477-84.
131. **MacIntyre D. L., Miyata S. T., Kitaoka M. and Pukatzki S.**; The *Vibrio cholerae* type VI secretion system displays antimicrobial properties; *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2010, 107(45):19520-4.
132. **Maier T. M., Havig A., Casey M., Nano F. E, Frank D. W. and Zahrt T. C.**; Construction and characterization of a highly efficient Francisella shuttle plasmid; *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70(12):7511-9.
133. **Marshall S. H., Conejeros P., Zahr M., Olivares J., Gómez F., Cataldo P. and Henríquez V.**; Immunological Characterization of a Bacterial Protein Isolated from Salmonid Fish Naturally Infected with *Piscirickettsia salmonis*; *Vaccine* 2007, 25 (11): 2095–2102.
134. **Marshall S. H., Gómez F. A., Ramírez R., Nilo L. and Henríquez V.**; Biofilm generation by *Piscirickettsia salmonis* under growth stress conditions: A putative in vivo survival/persistence strategy in marine environments; *Res. Microbiol.* 2012, In Press.
135. **Marshall S., Heath S., Henríquez V. and Orrego C.**; Minimally Invasive Detection of *Piscirickettsia salmonis* in Cultivated Salmonids Via the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, 64 (8): 3066–3069.

136. **Marshall S. H., Henríquez V., Gómez F. A., Cárdenas C.**; ISPSa2, the first mobile genetic element to be described and characterized in the bacterial facultative intracellular pathogen *Piscirickettsia salmonis*; FEMS Microbiol Lett. 2011, 314(1):18-24.
137. **Masi M. and Wandersman C.**; Multiple signals direct the assembly and function of a type 1 secretion system; J. Bacteriol. 2010, 192(15): 3861-9.
138. **Mattick J. S.**; Type IV pili and twitching motility; Annu. Rev. Microbiol. 2002, 56: 289-314.
139. **Mauel M. J., Miller D. L., Frazier K., Liggett A. D., Styer L., Montgomery-Brock D. and Brock J.**; Characterization of a piscirickettsiosis-like disease in Hawaiian tilapia; Dis. Aquat. Organ. 2003, 53(3):249-55.
140. **Mauel M. J., Ware C. and Smith P. A.**; Culture of *Piscirickettsia salmonis* on enriched blood agar; J. Vet. Diagn. Invest. 2008, 20(2):213-4.
141. **McQuiston J. R., Schurig G. G., Sriranganathan N. and Boyle S. M.**; Transformation of *Brucella* species with suicide and broad host-range plasmids; Methods of Molecular Biology 1995, 47:143-148.
142. **Medzhitov R. and Janeway C. A. Jr.**; Innate immune induction of the adaptive immune response; Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 1999, 64: 429-35.
143. **Meeusen E. N., Walker J., Peters A., Pastoret P. P. and Jungersen G.**; Current status of veterinary vaccines; Clin. Microbiol. Rev. 2007, 20(3): 489-510.
144. **Mikalsen J., Skjaervik O., Wiik-Nielsen J., Wasmuth M. A. and Colquhoun D. J.**; Agar culture of *Piscirickettsia salmonis*, a serious pathogen of farmed salmonid and marine fish. FEMS Microbiol. Lett. 2008, 278(1): 43-7.
145. **Morozova I., Qu X., Shi S., Asamani G., Greenberg J. E., Shuman H. A. and Russo J. J.**; Comparative sequence analysis of the icm/dot genes in *Legionella*; Plasmid 2004, 51(2): 127-47.

146. **Mota LJ, Journet L, Sorg I, Agrain C, and Cornelis GR.**; Bacterial injectisomes: needle length does matter; *Science*, 2005; 307: 1278.
147. **Nagai H. and Roy C. R.**; The DotA protein from *Legionella pneumophila* is secreted by a novel process that requires the Dot/Icm transporter; *EMBO J.* 2001, 20(21): 5962-70.
148. **Nierman W.C. , DeShazer D., Kim H. S., Tettelin H., Nelson K. E., Feldblyum T., et al.**; Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2004, 101: 14246-51.
149. **Ninio S., Zuckman-Cholon D. M., Cambronne E. D. and Roy C. R.**; The *Legionella* IcmS/IcmW protein complex is important for Dot/Icm-mediated protein translocation; *Mol. Microbiol.* , 2005, 55 (3), 912–926.
150. **Olivares J. and Marshall S. H.**; Determination of minimal concentration of *Piscirickettsia salmonis* in water columns to establish a fallowing period in salmon farms. *J. Fish. Dis.* 2010, 33(3): 261-266.
151. **Oliveira M. J., Costa A. C., Costa A. M., Henriques L., Suriano G., Atherton J. C., Machado J. C., Carneiro F., Seruca R., Mareel M., Leroy A. and Figueiredo C.**; *Helicobacter pylori* induces gastric epithelial cell invasion in a c-Met and type IV secretion system-dependent manner; *J. Biol. Chem.* 2006, 281(46): 34888-96.
152. **Ott M.**; Genetic approaches to study *Legionella pneumophila* pathogenicity; *FEMS Microbiol. Reviews*, 1994, 14(2): 161–176.
153. **Ottem K., Nylund A., Karlsbakk E., Friis-Möller A., Krossøy B. and Knappskog D.**; New species in the genus *Francisella* (Gammaproteobacteria; Francisellaceae); *Francisella piscicida* sp. nov. Isolated from cod (*Gadus morhua*); *Arch. Microbiol*, 2007.
154. **Palmer L. E., Hobbie S., Galan J. E. and Bliska J. B.**; YopJ of *Yersinia pseudotuberculosis* is required for the inhibition of macrophage TNF- α production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK; *Mol. Microbiol.* 1998, 27: 953–965.

155. **Plano G. V., Day J. B., and Ferracci F.**; Type III export: new uses for an old pathway; *Mol. Microbiol.* 2001, 40:284-293.
156. **Pizarro-Cerda J. and Cossart P.**; Bacterial adhesion and entry into host cells; *Cell.* 2006, 124: 715-727.
157. **Pohlner J., Halter R., Beyreuther K. and Meyer T. F.**; Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature*, 1987 325:458-462.
158. **Pugsley A. P.**; The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria; *Microbiol Rev.* 1993, 57(1):50-108.
159. **Pukatzki S., Ma AT, Sturtevant D., Krastins B., Sarracino D., Nelson W. C., Heidelberg J. F. and Mekalanos J. J.**; "Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the Dictyostelium host model system". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006, 103 (5): 1528–33.
160. **Py B., Loiseau L. and Barras F.**; Assembly of the type II secretion machinery of *Erwinia chrysanthemi*: direct interaction and associated conformational change between OutE, the putative ATP-binding component and the membrane protein OutL; *J. Mol. Biol.* 1999, 289:659-670.
161. **Rachek L. I., Tucker A. M., Winkler H. H. and Wood D. O.**; Transformation of *Rickettsia prowazekii* to rifampin resistance; *J. Bacteriol.* 1998, 180: 2118–2124.
162. **Rasmussen R.**,. En: Meuer, S., Wittwer, C., Nakagawara, K. (Eds.), Quantification on the LightCycler. Springer-Verlag, Berlin, Germany 2001, pp. 21–34.
163. **Reddy J.D., Reddy S.L., Hopkins D.L. and Gabriel D.W.**; TolC is required for pathogenicity of *Xylella fastidiosa* in *Vitis vinifera* grapevines; *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 2007, 20(4):403-410.
164. **Ridenour D. A., Cirillo S. L., Feng S., Samrakandi M. M. and Cirillo J. D.**; Identification of a gene that affects the efficiency of host cell infection by *Legionella pneumophila* in a temperature-dependent fashion; *Infect. Immun.* 2003, 71 6256–6263.

165. **Rikihisa Y., Lin M. and Niu H.**; Type IV secretion in the obligatory intracellular bacterium *Anaplasma phagocytophilum*; Cell Microbiol. 2010, 12(9): 1213-21.
166. **Rodríguez S., Borrego J. J., and Pérez-Prieto S. I.**; Infectious pancreatic necrosis virus: biology, pathogenesis, and diagnostic methods. Adv. Vir. Res., 2003 62: 113-165.
167. **Rodríguez S. A., Davis G. and Klose K. E.**; Targeted gene disruption in *Francisella tularensis* by group II introns; Methods 2009, 49(3):270-4.
168. **Rodríguez S. A., Yu J. J., Davis G., Arulanandam B. P. and Klose K. E.**; Targeted inactivation of *Francisella tularensis* genes by group II introns; Appl. Environ. Microbiol. 2008, 74(9):2619-26.
169. **Rojas V., Galanti N., Bols N. C., Jiménez V., Paredes R. and Marshall S. H.**; *Piscirickettsia salmonis* induces apoptosis in macrophages and monocyte-like cells from rainbow trout. J Cell Biochem. 2010, 110:468–476.
170. **Rojas V., Galanti N., Bols, N. C. and Marshall, S. H.**; Productive infection of *Piscirickettsia salmonis* in macrophages and monocyte-like cells from rainbow trout, a possible survival strategy. J. Cell Biochem. 2009, 108(3):631-7.
171. **Rojas M. V., Olivares J., del Río R. and Marshall S. H.**; Characterization of a novel and genetically different small infective variant of *Piscirickettsia salmonis*; Microb. Pathog. 2008, 44(5): 370-8.
172. **Saenz H. L, Engel P., Stoeckli M. C., Lanz C., Raddatz G., Vayssier-Taussat M., Birtles R., Schuster S. C. and Dehio C.**; Genomic analysis of *Bartonella* identifies type IV secretion systems as host adaptability factors; Nat. Genet. 2007, 39 (12): 1469-76.
173. **Sambrook J. and Russel D. W.**; Molecular cloning: a laboratory manual. 3rded. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
174. **Sauer J. D., Shannon J. G., Howe D., Hayes S. F., Swanson M. S. and Heinzen R. A.**; Specificity of *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii* vacuoles and versatility of *Legionella pneumophila* revealed by coinfection; Infect. Immun. 2005, 73(8): 4494-504.

175. **Schiewe M. H., Crosa J. H. and Ordal E.**; Deoxyribonucleic acid relationships among marine *Vibrios* pathogenic to fish; *Can. J. Microbiol.* 1977, 23: 954-958.

176. **Schroeder G. N., Petty N. K., Mousnier A., Harding C. R., Vogrin A. J., Wee B., Fry N. K., Harrison T. G., Newton H. J., Thomson N. R., Beatson S. A., Dougan G., Hartland E. L. and Frankel G.**; *Legionella pneumophila* strain 130b possesses a unique combination of type IV secretion systems and novel Dot/Icm secretion system effector proteins; *J. Bacteriol.* 2010, 192(22):6001-16.

177. **Schulein R. and Dehio C.**; The VirB/VirD4 type IV secretion system of *Bartonella* is essential for establishing intraerythrocytic infection; *Mol. Microbiol.* 2002, 46: 1053–1067.

178. **Segal G., Feldman M. and Zusman T.**; The Icm/Dot type-IV secretion systems of *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*; *FEMS Microbiol. Rev.* 2005, 29: 65–81.

179. **Segal, G., Russo J. J. and Shuman H. A.**; Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of *Legionella pneumophila*; *Mol. Microbiol.* 1999, 34:799–809.

180. **Sexton J. A., Pinkner J. S., Roth R., Heuser J. E, Hultgren S. J. and Vogel J. P.**; The *Legionella pneumophila* PilT homologue DotB exhibits ATPase activity that is critical for intracellular growth; *J Bacteriol.* 2004, 186(6): 1658–1666.

181. **Shin S. and Roy C. R.**; Host cell processes that influence the intracellular survival of *Legionella pneumophila*; *Cell Microbiol.* 2008, 10(6):1209-20.

182. **Sigma-Aldrich**; TargeTron™ Gene Knockout System: User Manual.

183. **Sinai A. P. and Joiner K. A.**; Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles; *Annu. Rev. Microbiol.* 1997, 51: 415-462.

184. **Smail, D.A., Bain, N., Bruno, D.W., King, J.A., Thompson, F., Pendry, D.J., Morrice, S., Cunnigham, C.O.**; Infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts in the Shetland Isles, Scotland: virus identification, histopathology,

immunohistochemistry and genetic comparison with Scottish mainland isolates. *J. Fish Dis.*, 2009 29: 31–41.

185. **Smith P. A.; Vecchiola, I. M.; Oyanedel, S.; Garcés, L. H.; Larenas, J. and Contreras, J.**; Antimicrobial sensitivity of four isolates of *Piscirickettsia salmonis*. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 1996, 16: 164-168.

186. **Smith, P., Zurita, L., Canale, F., Ferreira, A. and Toro H.**; Elisa to determine antiK99 pilus antibody in the sera of normal and diarrhoeic calves; *Veterinary Microbiology* 1994, 40: 387-392.

187. **Suhan M. L., Chen S. Y. and Thompson H. A.**; Transformation of *Coxiella burnetii* to ampicillin resistance; *J. Bacteriol.* 1996, 178(9):2701-8.

188. **Sutcliffe I. C.**; New insights into the distribution of WXG100 protein secretion systems; *Antonie van Leeuwenhoek* 2011, 99:127–131.

189. **Swanson M. S. and Isberg R. R.**; Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum; *Infect. Immun.* 1995, 63(9):3609-20.

190. **Tyson G. W., Chapman J., Hugenholtz P., Allen E. E., Ram R. J., Richardson P. M., Solovyev V. V., Rubin E. M., Rokhsar D. S. and Banfield J. F.**; Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 2004, 428(6978):37-43.

191. **Thanassi D. G. and Hultgren S. J.**; Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane; *Curr. Op. Cell Biol.*, 2000, 12:420-430.

192. **Tilney L. G., Harb O. S., Connelly P. S., Robinson C. G. and Roy C. R.**; How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane; *J. Cell Sci.* 2001, 114(24):4637-50.

193. **Toft C. and Fares M. A.**; The evolution of the flagellar assembly pathway in endosymbiotic bacterial genomes; *Mol. Biol. Evol.* 2008, 25(9): 2069-76.

194. **Torres J. and Backert S.**; Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection; *Helicobacter*, 2008 1:13-7.
195. **Troisfontaines P. and Cornelis G. R.**; Type III secretion: More systems than you think; *Physiology*, 2005, 5: 326-339.
196. **Troyer J. M., Radulovic S. and Azad A. F.**; Green fluorescent protein as a marker in *Rickettsia typhi* transformation; *Infect. Immun.* 1999, 67:3308–3311.
197. **Tseng T. T., Tyler B. M. and Setubal J. C.**; Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology; *BMC Microbiol.* 2009, 9 Suppl 1:S2.
198. **Vadovic P., Fodorová M. and Toman R.**; Structural features of lipid A of *Piscirickettsia salmonis*, the etiological agent of the salmonid rickettsial septicaemia; *Acta Virol.* 2007, 51(4): 249-59.
199. **Van Wely K. H. M., Swaving J., Freudl R. and Driessen A. J. M.**; Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria; *FEMS Microbiol. Rev.* 2001, 25:437-454.
200. **Venegas C.**; *Piscirickettsia salmonis*: Prospección en fauna marina asociada a cultivos de salmónidos infectados. Periodo invierno-primavera. Tesis (Médico Veterinario). Santiago, Chile, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias; 1996.
201. **Vincent C. D., Buscher B. A., Friedman J. R., Williams L. A., Bardill P. and Vogel J. P.**; Identification of non-dot/icm suppressors of the *Legionella pneumophila* Δ dotL lethality phenotype; *J. Bacteriol.* 2006, 188(23): 8231-43.
202. **Voth D. E., Beare P. A., Howe D., Sharma U. M., Samoilis G., Cockrell D. C., Omsland A., Heinzen R. A.**; The *Coxiella burnetii* cryptic plasmid is enriched in genes encoding type IV secretion system substrates; *J. Bacteriol.* 2011, 193(7):1493-503.

203. **Ward D. V., Draper O., Zupan J. R. and Zambryski P. C.;** Peptide linkage mapping of the *Agrobacterium tumefaciens* vir-encoded type IV secretion system reveals protein subassemblies; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2002, 99(17): 11493-500.
204. **Wilhelm V., Huaracán B., Martínez R., Roseblatt M., Burzio L. O. and Valenzuela P. D.;** Cloning and expression of the coding regions of the heat shock proteins HSP10 and HSP16 from *Piscirickettsia salmonis*; Biol. Res. 2003, 36 (3-4):421-8.
205. **Walsh P. S.; Metzger D. A. and Higuchi R.;** Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. BioTechniques, 1991 10:506-513.
206. **Watnick P. I. and Kolter R.;** Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm; Mol. Microbiol. 1999, 34(3): 586-595.
207. **Welch R. A. and Pellett S.;** Transcriptional organization of the *Escherichia coli* hemolysin genes; J. Bacteriol. 1988, 170(4): 1622-30.
208. **Whelan J. A., Russell N. B. and Whelan M. A.;** A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR; J. Immunol. Methods 2003, 278(1-2):261-9.
209. **Wilhelm V., Soza C., Martinez R., Roseblatt M., Burzio L., and Valenzuela P.;** Production and immune response of recombinant Hsp60 and Hsp70 from the salmon pathogen *Piscirickettsia salmonis*; Biol. Res. 2005, 38: 69-82.
210. Wood D. O and Azad A. F.; Genetic manipulation of rickettsiae: A preview; Infect. Immun. 2000, 68: 6091-6093.
211. **Xicohtencatl-Cortes J., Monteiro-Neto V., Ledesma M. A., Jordan D. M., Francetic O., Kaper J. B., Puente J. L. and Girón J. A.;** Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7; J. Clin. Invest. 2007, 117(11): 3519-29.
212. **Yañez A. J., Valenzuela K., Silva H., Retamales J., Romero A., Enriquez R., Figueroa J., Claude A., Gonzalez J., Avendaño-Herrera R. and Carcamo J. G.;** Broth medium for the successful culture of the fish pathogen *Piscirickettsia salmonis*; Dis. Aquat. Organ. 2012, 97(3):197-205.

213. **Yeo H. J. and Waksman G.**; Unveiling molecular scaffolds of the type IV secretion system; *J. Bacteriol.* 2004, 186(7): 1919-26.
214. **Zamboni D. S., McGrath S., Rabinovitch M. and Roy C. R.**; *Coxiella burnetii* express type IV secretion system proteins that function similarly to components of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system; *Mol. Microbiol.* 2003, 49(4): 965-76.
215. **Zaror L., Collado L., Bohle H., Landskron E. Montaña F. and Avendaño F.**; *Saprolegnia parasitica* in salmon and trout from southern Chile; *Arch. Med. Vet.* 2004, XXXVI, N° 1.
216. **Zusman T., Yerushalmi G. and Segal G.**; Functional similarities between the icm/dot pathogenesis systems of *Coxiella burnetii* and *Legionella pneumophila*; *Infect. Immun.* 2003, 71(7): 3714-23.
217. <http://aqua.intervet.com/news/2004-11-15 - srs.asp>.
218. www.salmonchile.cl
219. **Pharmaq**; Patent WO/2008/002152: Process for culturing bacteria of the *Piscirickettsia* genus; Norway 2008.

12. ANEXOS:

12.1 Anexo 1: Composición medios de Cultivo probados para el crecimiento de *P. salmonis*

Medio Marino (Gibco):

Medio Marino (Marine Broth Gibco) Fórmula 1 litro	
Peptona	5.0 g
Extracto de Levadura.....	1.0 g
Citrato Férrico.....	0.1 g
Cloruro de Sodio	19.45 g
Cloruro de Magnesio..	8.8 g
Sulfato de Sodio.....	3.24 g
Cloruro de Calcio..	1.8 g
Cloruro de Potasio.	0.55 g
Bicarbonato de Sodio.....	0.16 g
Bromuro de Potasio.....	0.08 g
Cloruro de Estroncio.....	34.0 mg
Ácido Bórico.....	22.0 mg
Silicato de Sodio.....	4.0 mg
Fluoruro de Sodio.....	2.4 mg
Nitrato de Amonio... ..	1.6 mg
Fosfato disódico.....	8.0 mg

12.2 Anexo 2: Lista organismos y proteínas utilizadas para el diseño de cebadores degenerados para los diferentes sistemas de secreción.

Proteína	GenBank	Organismo	Sistema Secreción
HlyD	CAO87520.1	<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	SSTI
HlyD	CAA74193.1	<i>Escherichia coli</i>	SSTI
HlyD	YP_245452.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SSTI
HlyD	ZP_04990152.1	<i>Francisella novicida</i> GA99-3548	SSTI
HlyD	ABQ54911.1	<i>Legionella pneumophila</i> cepa Corby	SSTI
HlyB	AAA20545.2	<i>Escherichia coli</i>	SSTI
HlyB	AFB78155.1	<i>Francisella tularensis</i> subsp. tularensis	SSTI
HlyB	YP_855893.1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	SSTI
HlyB	CBK43143.1	<i>Nitrospira defluvii</i>	SSTI
HlyB	YP_236148.1	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. syringae	SSTI
PuIE/LspE	YP_001250058.1	<i>Legionella pneumophila</i> cepa Corby	SSTII
PuIE/GspE	YP_001902178.1	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. Campestris	SSTII
PuIE/GspE	YP_006522595.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> DSM 10701	SSTII
PuIE/GspE	NP_417785.1	<i>Escherichia coli</i> cepa K-12	SSTII
PuIE/GspE	YP_156406.1	<i>Idiomarina loihiensis</i> L2TR	SSTII
PuID/LspD	YP_003618598.1	<i>Legionella pneumophila</i> 2300/99 Alcoy	SSTII
PuID	YP_005660093.1	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. jejuni S3	SSTII
PuID	YP_002240367.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 342	SSTII
PuID	YP_156407.1	<i>Idiomarina loihiensis</i> L2TR	SSTII
PuID	YP_003000551.1	<i>Escherichia coli</i> BL21	SSTII
LcrD/YscV	YP_004210056.1	<i>Yersinia pestis</i> Java 9	SSTIII
LcrD	YP_791542.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14	SSTIII
LcrD/AscV	Q8GA91	<i>Aeromonas salmonicida</i>	SSTIII
MixA	NP_085310.1	<i>Shigella flexneri</i>	SSTIII
MixA	AAK53923.1	<i>Escherichia coli</i>	SSTIII
MixA	EHN47669.1	<i>Salmonella enterica</i>	SSTIII
MixA	YP_005207200.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> F113	SSTIII
IpaB	NP_085290.1	<i>Shigella flexneri</i> 2002017	SSTIII
IpaB	YP_217804.1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica	SSTIII
IpaB	EJL02335.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Q2-87	SSTIII
IpaC	YP_005712019.1	<i>Shigella flexneri</i> 2002017	SSTIII
IpaC	EHC34084.1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica	SSTIII
IpaC	NP_902288.1	<i>Chromobacterium violaceum</i>	SSTIII
IpaD	YP_005712018.1	<i>Shigella flexneri</i>	SSTIII
IpaD	NP_902287.1	<i>Chromobacterium violaceum</i>	SSTIII
IpaD	EHC53294.1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica	SSTIII

Proteína	GenBank	Organismo	Sistema Secreción
VirB11	YP_001967541.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	SSTIV-A (VirB/D)
VirB11	YP_006226978.1	<i>Helicobacter pylori</i>	SSTIV-A (VirB/D)
VirB11	AAX86708.1	<i>Wolbachia endosymbiont</i>	SSTIV-A (VirB/D)
VirB11/Lvh11	YP_001252059.1	<i>Legionella pneumophila</i> cepa Corby	SSTIV-A (VirB/D)
VirB2	YP_001967532.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	SSTIV-A (VirB/D)
VirB2/Lvh2	YP_006507317.1	<i>Legionella pneumophila</i> cepa Corby	SSTIV-A (VirB/D)
VirB2	NP_940724.1	<i>Pseudomonas syringae</i>	SSTIV-A (VirB/D)
VirB2	NP_541003.1	<i>Brucella melitensis</i>	SSTIV-A (VirB/D)
VirB5/Lvh5	YP_095284.1	<i>Legionella pneumophila</i>	SSTIV-A (VirB/D)
VirB5	AAT35206.1	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. maculicola	SSTIV-A (VirB/D)
VirB5	AAZ50522.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	SSTIV-A (VirB/D)
VirD4	AAF77174.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	SSTIV-A (VirB/D)
VirD4/LvhD4	AAU27329.1	<i>Legionella pneumophila</i>	SSTIV-A (VirB/D)
VirD4	AAR02183.1	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. syringae	SSTIV-A (VirB/D)
DotB	AAU28734.1	<i>Legionella pneumophila</i> cepa Philadelphia	SSTIV-B (Dot/Icm)
DotB	ZP_06186679.1	<i>Legionella longbeachae</i> D-4968	SSTIV-B (Dot/Icm)
DotB	EDP46591.1	<i>Rickettsiella grylli</i>	SSTIV-B (Dot/Icm)
DotB	ZP_02218390.1	<i>Coxiella burnetii</i> Q321	SSTIV-B (Dot/Icm)
IcmK	NP_82061	<i>Coxiella burnetii</i> RSA 493	SSTIV-B (Dot/Icm)
IcmK	YP_094494.1	<i>Legionella pneumophila</i> cepa Philadelphia	SSTIV-B (Dot/Icm)
IcmK	ZP_06187708.1	<i>Legionella longbeachae</i> D-4968	SSTIV-B (Dot/Icm)
IcmK	ZP_02062560.1	<i>Rickettsiella grylli</i>	SSTIV-B (Dot/Icm)
IcmF	YP_094502.1	<i>Legionella pneumophila</i> cepa Corby	SSTIV-B (Dot/Icm)
IcmF	YP_002304943.1	<i>Coxiella burnetii</i> CbuK_154	SSTIV-B (Dot/Icm)
IcmF	EEZ97099.1	<i>Legionella longbeachae</i> D-4968	SSTIV-B (Dot/Icm)
IcmW	ZP_02062290.1	<i>Rickettsiella grylli</i>	SSTIV-B (Dot/Icm)
IcmW	YP_002302947.1	<i>Coxiella burnetii</i> CbuG_K212	SSTIV-B (Dot/Icm)
IcmW	AAU28746.1	<i>Legionella pneumophila</i> cepa Philadelphia	SSTIV-B (Dot/Icm)
IcmW	ZP_06186684.1	<i>Legionella longbeachae</i> D-4968	SSTIV-B (Dot/Icm)

12.3 Anexo 3: Lista de cebadores degenerados utilizados para la amplificación de los genes de los diferentes sistemas de secreción.

Sistema secreción	Gen	Primer	Secuencia
SSTI	<i>hlyD</i>	HlyD-F1	5'-GAY CAT ACG ACR GTB MTD CAT GCY -3'
SSTI	<i>hlyD</i>	HlyD-R1	5'-CAR ATM ATT YTV ACY WSY GAT MAG-3'
SSTI	<i>hlyD</i>	HlyD-R1	5'-GCM AGS CKT TGS GCR ATR ATY A-3'
SSTI	<i>hlyB</i>	HlyB-F1	5'-GAM TAT CCD AAD GAR ATM RAM GGS-3'
SSTI	<i>hlyB</i>	HlyB-F2	5'-TCM GAA CGK CGH ATC CCM CAR GAT-3'
SSTI	<i>hlyB</i>	HlyB-R1	5'-CAR ATC ATT YTS ACC WSY GAT CGM-3'
SSTII	<i>pulG</i>	PulG-F1	5'-TCT TTG ATC GAA ATT ATG GTT GTT G-3'
SSTII	<i>pulG</i>	PulG-R1	5'-CAA CAA CCA TAA TTT CGA TGA AAG A-3'
SSTII	<i>pulG</i>	PulG-F2	5'-GGT AAC TGG GAT GAC CAC TCA-3'
SSTII	<i>pulG</i>	PulG-R2	5'-TGA GTG GTC ATC CCA GTT ACC-3'
SSTII	<i>pilD</i>	PilD-F1	5'-AGC TAY YTR ACC YTG CGC GGY-3'
SSTII	<i>pilD</i>	PilD-F2	5'-CGG MAG YTT YCT TAA CGT VGT Y-3'
SSTII	<i>pilD</i>	PilD-R1	5'-TTR AAR TCK CCR TGR CCC ATD CC-3'
SSTII	<i>pilD</i>	PilD-R2	5'-CGG MAG YTT YCT TAA CGT VGT Y-3'
SSTII	<i>pilB</i>	PilB-F1	5'-GAY ATW CAC TTY GAR CCY TAT GAR-3'
SSTII	<i>pilB</i>	PilB-F2	5'-TCM GAA CGK CGH ATC CCM CAR GAT-3'
SSTII	<i>pilB</i>	PilB-R1	5'-GCR CTG GTK GTR TGY AGR GTR GA-3'
SSTII	<i>pilB</i>	PilB-R2	5'-GCM AGS CKT TGS GCR ATR ATY A-3'
SSTIII	<i>mixA</i>	MixA-F1	5'-ATR TTY CGK CTC GCV CTB TC-3'
SSTIII	<i>mixA</i>	MixA-R1	5'-RAA CTT CAT SGC GCC RTC-3'
SSTIII	<i>mixA</i>	MixA-R2	5'-GCW ATM ARS AGS GCM GG-3'
SSTIII	<i>mixA</i>	MixA-F2	5'-GCC MGC KAT YGC RTC SCC YTT-3'
SSTIII	<i>lcrD</i>	LcrD-For1	5'-CCG GAA TTC ATC CCC ATG ATC TTG AGT-3'
SSTIII	<i>lcrD</i>	LcrD-Rev1	5'-CCG GAA TTC TAT CGC TAC CCA AGT CTG-3'
SSTIII	<i>lcrD</i>	LcrD-For2	5'-CAR CGW GTW TGT TTT GGK TGY GGW-3'
SSTIII	<i>lcrD</i>	LcrD-Rev2	5'-AGT ATG GGH TCH GTH GTY GGW GAA AAA-3'
SSTIII	<i>ipaD</i>	IpaD-For	5'-GCS CTV AAY GTS GCY TCW AC-3'
SSTIII	<i>ipaD</i>	IpadD-Rev1	5'-TTG TGC VAC YAR ACC RTC VCC-3'
SSTIII	<i>ipaD</i>	IpadD-Rev2	5'-ATC RTA CAT YAR YTC ATC CAG SG-3'
SSTIII	<i>ipaC</i>	IpaC-For	5'-ACW GAT YTS GAR ATK GAA ATG GAT-3'
SSTIII	<i>ipaC</i>	IpaC-Rev1	5'-ACW GAT GGK CAY AGA ATG KCT ATM-3'
SSTIII	<i>ipaC</i>	IpaC-Rev2	5'-ATG GAG CGA GAT ATT AGC AAG G-3'

Sistema secreción	Gen	Primer	Secuencia
SSTIV (VirB/D4)	<i>virB11</i>	VirB11-F1	5'-GAY CCR AAR ACY GWW GAA ATY-3'
SSTIV (VirB/D4)	<i>virB12</i>	VirB11-F2	5'-GTM CAR CTG GTS ATY CCM CCR-3'
SSTIV (VirB/D4)	<i>virB11</i>	VirB11-R1	5'-GGT CMG GSC GCA TWC KSA G-3'
SSTIV (VirB/D4)	<i>virB12</i>	VirB11-R2	5'-BAT RAT BCK RTC SGG TCT KA-3'
SSTIV (VirB/D4)	<i>virB2</i>	VirB2-F	5'-GTM CAR CTG GTS ATY CCM CCR-3'
SSTIV (VirB/D4)	<i>virB2</i>	VirB2-R1	5'-BAT RAT BCK RTC SGG TCT KA-3'
SSTIV (VirB/D4)	<i>virB2</i>	VirB2-R2	5'-TGT TGT YTT GCC KSW WCC KG-3'
SSTIV (VirB/D4)	<i>virB5</i>	VirB5-F1	5'-ACW GGY AAR CTR AAA GGM TCR AAA-3'
SSTIV (VirB/D4)	<i>virB5</i>	VirB5-F2	5'-ATT ATG TTT GCK GTT YTG GAT ACY-3'
SSTIV (VirB/D4)	<i>virB5</i>	VirB5-R1	5'-TTT YGA KCC TTT YAG YTT RCC WGT-3'
SSTIV (VirB/D4)	<i>virB5</i>	VirB5-R2	5'-CAA CGC CTT GGT TAA GTG TGA CCG-3'
SSTIV (Dot/Icm)	<i>icmK</i>	IcmK-F	5'-TCA ACM GGW CCY CCT TGG CC-3'
SSTIV (Dot/Icm)	<i>icmK</i>	IcmK-R1	5'-GCD ACD GCA TAA TCV ACS GC-3'
SSTIV (Dot/Icm)	<i>icmK</i>	IcmK-R2	5'-CHG CAT GYG TYC CAT CYG C-3'
SSTIV (Dot/Icm)	<i>dotB</i>	dotB-F1	5'-GCK TCA GAT ATW ACW ATY CAA AC-3'
SSTIV (Dot/Icm)	<i>dotB</i>	dotB-F2	5'-GCW GAR GTK TAT GGM MGM Y-3'
SSTIV (Dot/Icm)	<i>dotB</i>	dotB-R1	5'-TGT TTC AAK AAT RTC GAT RGT-3'
SSTIV (Dot/Icm)	<i>dotB</i>	dotB-R2	5'-YTC MCK YAG KGC WAC MCG-3'
SSTIV (Dot/Icm)	<i>dotB</i>	dotB-F3	5'-GCW CAR GTK TAT GGM MG-3'
SSTIV (Dot/Icm)	<i>dotB</i>	dotB-R3	5'-SCC YGT TAA AGC GGC YTC-3'
SSTIV (Dot/Icm)	<i>icmW</i>	IcmW-for1	5'-ATG CCW GAT YTR WSS CAT RAA GCC-3'
SSTIV (Dot/Icm)	<i>icmW</i>	IcmW-for2	5'-TCC YTK TGY YTS GGT TAY GG-3'
SSTIV (Dot/Icm)	<i>icmW</i>	IcmW-rev	5'-TAR TAA CCK YAG YCK TTC AAA TAC MAW-3'
SSTIV (Dot/Icm)	<i>icmF</i>	IcmF-F	5'-GGW TCR YTA MTK TCS GTW-3'
SSTIV (Dot/Icm)	<i>icmF</i>	IcmF-R2	5'-GAT AGY YCK ACB GTD TTA GTT-3'
SSTIV (Dot/Icm)	<i>icmF</i>	IcmF-R1	5'-CAA TTT WCG RCC TCC RCG CAT R-3'