

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**“CONTRIBUCIÓN DEL SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO VI
CODIFICADO EN LA ISLA GENÓMICA SPI-6 A LOS
MECANISMOS DE VIRULENCIA DE *SALMONELLA ENTERICA*
SEROVAR TYPHIMURIUM”**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Magíster en Bioquímica área de Especialización en
Bioquímica de Proteínas Recombinantes y Memoria para optar
al Título de Bioquímico por:

LORENZO EUGENIO LEIVA ARAYA

DIRECTORES DE TESIS

Dra. Lucía Inés Contreras Osorio

Dr. Carlos Santiviago Cid

Santiago-Chile

Enero 2013

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

LORENZO EUGENIO LEIVA ARAYA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: en Bioquímica de Proteínas Recombinantes y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día _____

Director de Tesis:

Lucía Inés Contreras Osorio _____

Co-director de Tesis:

Carlos Santiviago Cid _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Daniela Seelenfreund Hirsch _____

Dr. Javier Puente Piccardo _____

Dr. Francisco P. Chávez Espinosa _____

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, con el financiamiento del proyecto FONDECYT 1100092 de la Dra. Inés Contreras O., y la beca de Rebaja de Arancel de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas (2010-2012) obtenida por Lorenzo Leiva Araya.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo agradezco a la Dra. Inés Contreras por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su apoyo, confianza y estímulo durante estos dos años de tesis.

A los integrantes de la Comisión Evaluadora de la tesis, Dres. Daniela Seelenfreund, Javier Puente y Francisco Chávez, por sus valiosas críticas y sugerencias que contribuyen a mejorar el contenido y forma de esta tesis.

A Sergio, Cliff y la profesora Mercedes, docentes del área de microbiología, quienes contribuyeron desde distintas aristas constantemente al desarrollo de este trabajo.

A Carlos Blondel por enseñarme gran parte de lo que sé respecto a trabajo en laboratorio y transmitirme su perseverancia a la hora de trabajar. Siempre con una excelente disposición por enseñar y discutir hasta los resultados más monstruosos.

A todos los que me han acompañado en el laboratorio: Bernardo, David y Blondel, con quienes hemos recorrido las extensas, desoladas, incomprensibles y en ocasiones frustrantes llanuras del T6SS. A Pía, Pipe, Grillo y Cracra, con quienes compartí tanto dentro como fuera del laboratorio, dentro de los límites que les permitía su república. Al Dr. Sarmiento, quien con su constante preocupación y ayuda hizo de este trabajo una carga más liviana. A Paulita, Chechi, Anilei, Dr. Molina, Camila y Rodrigo, quienes junto a los profes y todos los anteriormente mencionados hacen del laboratorio un lugar cálido y entretenido, muy difícil de dejar.

A todos mis compañeros de la facultad, pero en especial a Pablo Morales, Camila López y Pía Boza, con quienes tuve la dicha de compartir distintas etapas y de quienes recibí un constante estímulo y una amistad sincera.

A la Universidad de Chile, institución de la cual me sentí orgulloso de pertenecer todos estos años, cuya pluralidad me enriqueció enormemente. A todos aquellos profesores que aman lo que hacen y junto con la enseñanza de las ciencias no olvidaron transmitir su belleza. A todos

aquellos integrantes no académicos de la universidad que hacen su trabajo con la convicción de que también tienen un rol en nuestra formación.

A mis padres, quienes durante años han hecho su mayor esfuerzo para verme en el lugar en que me encuentro hoy. Por sus escasas palabras y por sus innumerables actos.

En especial debo agradecer a María, la principal responsable de que estos siete años de universidad pueda resumirlos hoy en una sonrisa.

Los resultados y conocimientos generados de la presente Tesis dieron origen total o parcialmente a las siguientes publicaciones y presentaciones a congresos.

Publicaciones:

Blondel, C.J., Jimenez, J., **Leiva, L.E.**, Alvarez, S.A., Pinto, B.I., Contreras, F., Pezoa, D., Santiviago, C.A., Contreras, I. (2013). The Type VI Secretion System encoded in SPI-19 is required for *Salmonella* Gallinarum survival within infected macrophages. Infection and Immunity. (Aceptada).

Presentaciones orales:

Leiva L.E., Pezoa D., Blondel C., Álvarez S.A., Santiviago C.A., Contreras I. “Role of the *Salmonella* Typhimurium Type VI Secretion System in the interaction with murine and avian macrophages”. XXXIV Congreso Chileno de Microbiología. Valdivia, Chile. 2012.

Presentaciones a congresos nacionales:

Pezoa D., **Leiva L.E.**, Pinto B.I., Blondel C.J., Mardones P.C., Álvarez S.A., Andrews-Polymenis H., Santiviago C.A. y I. Contreras. “The Type VI Secretion System encoded in *Salmonella* Pathogenicity Island 6 contributes to gastrointestinal colonization and systemic spread of *Salmonella enterica* serotype Dublin in the murine and avian hosts”. XXXIV Congreso Chileno de Microbiología. Valdivia, Chile. 2012.

Blondel C.J., **Leiva L.E.**, Pinto B., Álvarez S.A., Santiviago C.A., Contreras I. “*Salmonella* Gallinarum utilizes a Type VI Secretion System to survive inside murine and avian macrophages”. XXXIV Congreso Chileno de Microbiología. Valdivia, Chile. 2012.

Pezoa D., **Leiva L.E.**, Pinto B.I., Blondel C.J., Mardones P.C., Álvarez S.A., Andrews-Polymenis H., Santiviago C.A., Contreras I. “Type VI Secretion Systems and their contribution to *Salmonella enterica* pathogenicity”. Congreso Ciencia Joven, Instituto de Ciencias Biomédicas. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 2012.

Leiva L.E., Blondel C.J., Zaldívar, M., Santiviago C.A., Contreras I. "A *Salmonella* Typhimurium Type VI Secretion System is expressed within murine and avian macrophages". XXXIII Congreso Chileno de Microbiología. Olmué, Chile. 2011.

Pinto B.I., **Leiva L.E.**, Mardones P., Alvarez S.A., Blondel C.J., Santiviago C.A., Contreras I. "Expression of the *Salmonella* Dublin Type Six Secretion Systems inside murine macrophages". XXXIII Congreso Chileno de Microbiología. Olmué, Chile. 2011.

Pinto, B.I., **Leiva, L.E.**, Pezoa, D., Blondel, C.J., Santiviago, C.A., Contreras I. "Contribution of Type VI Secretion Systems to virulence of *Salmonella enterica*". Congreso Ciencia Joven, Instituto de Ciencias Biomédicas. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 2011.

Presentaciones a congresos internacionales:

Pezoa D., Andrews-Polymenis H., Blondel C.J., **Leiva L.E.**, Pinto B.I., Alvarez S.A., Santiviago C.A., Contreras I. "The Type VI Secretion Systems encoded in *Salmonella* pathogenesis islands SPI-6 and SPI-19 contribute to intestinal colonization of chickens and systemic spread by *Salmonella enterica* serotype Typhimurium". 22nd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Sevilla, Spain. 2012.

Leiva, L.E., Blondel, C.J., Santiviago, C.A., Contreras, I. "Role of the *Salmonella* Typhimurium Type VI Secretion System in the interaction with murine and avian macrophages". 21st Meeting of the Latin American Microbiology Association (ALAM). Santos, Brasil. 2012.

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	i
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	iv
ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	ix
SUMMARY	xi
1. INTRODUCCIÓN	01
1.1. Ciclo infeccioso y mecanismos moleculares de patogenicidad de <i>S. Typhimurium</i>	02
1.2. Sistemas de secreción de proteínas	03
1.3. Sistema de secreción tipo VI: Organización genética y estructura	05
1.4. Sistema de Secreción Tipo VI en <i>Salmonella</i>	07
1.5. Participación del Sistema de Secreción tipo VI en la virulencia de <i>S. Typhimurium</i>	08
2. MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.1. Reactivos	11
2.2. Cepas bacterianas	12
2.3. Plásmidos	14
2.4. Partidores	14
2.5. Medios y condiciones de cultivo bacteriano	16
2.6. Técnicas básicas de biología molecular	16
2.6.1. Extracción de DNA cromosomal	16
2.6.2. Extracción de DNA plasmidial	16
2.6.3. Purificación de DNA de reacciones de PCR y digestiones	17
2.6.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	17
2.6.5. Transformación de bacterias con plásmidos o productos de PCR	17
2.6.6. PCR de colonias	18
2.7. Construcción del plásmido pLZ01	18
2.7.1. Aislamiento y purificación del marco abierto de lectura del reportero GFP	20
2.7.2. Generación y purificación del “esqueleto” de pLZ01 a partir de pCLF3	21
2.7.3. Reacción de ligación	22

2.8. Construcción de fusiones traduccionales y transcripcionales a <i>gfp</i> en <i>S. Typhimurium</i> para la observación por microscopía de epifluorescencia	22
2.8.1. Obtención de productos de PCR para la generación de fusiones traduccionales y fusiones transcripcionales	23
2.8.2. Incorporación de las fusiones al cromosoma por recombinación homóloga	24
2.8.3. Transducción de fusiones	24
2.8.3.1. Preparación de los lisados de P22 de las cepas dadoras	25
2.8.3.2. Transducción	25
2.8.3.3. Selección de transductantes	25
2.8.4. Eliminación del <i>cassette</i> de resistencia	26
2.8.5. Transformación con el plasmidio pmCherry	26
2.9. Obtención de mutantes en genes del T6SS codificado en SPI-6 de <i>S. Typhimurium</i>	27
2.9.1. Obtención del producto de PCR para la mutagénesis	27
2.9.2. Complementación de mutantes	28
2.10. Construcción de cepas transformadas con derivados de pFlagTEM1	29
2.10.1. Clonamiento de <i>vgrG</i> en el vector pFlagTEM1	29
2.10.1.1. Generación del inserto <i>vgrG</i>	29
2.10.1.2. Digestión y linealización de pFlagTEM1	30
2.10.1.3. Reacción de ligación	30
2.10.2. Evaluación de la producción <i>in vitro</i> de la proteína recombinante VgrGFT	31
2.10.2.1. Obtención de proteínas a partir de DH5 α /pVgrGFT y 14028S/pVgrGFT	31
2.10.2.2. SDS-PAGE	32
2.10.2.3. Electrotransferencia e inmunoblot	32
2.10.2.4. Tinción de gel de poliacrilamida con azul de Coomassie	33
2.10.3. Transformación de cepas con pFlagTEM1, pSipAFT y pVgrGFT	33
2.11. Condiciones de cultivo celular	34
2.11.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo	34
2.11.2. Preparación de monocapas de células RAW264.7 y HD11	34
2.12. Ensayo de producción de componentes del T6SS en el interior de macrófagos	35
2.13. Ensayo de translocación de componentes del T6SS al citoplasma de macrófagos	37
2.14. Ensayo de invasión y supervivencia en macrófagos	39
2.15. Análisis estadístico	41

3. RESULTADOS	42
3.1. Construcción del vector pLZ01 para la generación de fusiones cromosomales a <i>gfpmut3</i>	42
3.2. Análisis de la producción de Hcp1, Hcp2 y VgrG durante la infección de macrófagos.....	45
3.3. Análisis de translocación de la proteína VgrGFT al citoplasma de macrófagos RAW264.7 y HD11.....	54
3.4. El T6SS de <i>S. Typhimurium</i> contribuye a la invasión de macrófagos murinos y aviares, pero no así a la supervivencia intracelular.....	64
4. DISCUSIÓN	69
5. CONCLUSIONES	77
6. BIBLIOGRAFÍA	78

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1: Cepas bacterianas utilizadas en la presente tesis	12
Tabla 2: Plasmidios utilizados en la presente tesis	14
Tabla 3: Partidores utilizados en la presente tesis	14
Figura 1: Representación esquemática de los Sistemas de Secreción	
Tipo I al V, descritos en bacterias Gram negativo	04
Figura 2: Representación esquemática del sistema de secreción tipo VI	05
Figura 3: Representación esquemática del T6SS codificado en	
SPI-6 (T6SS _{SPI-6}) identificado en <i>S. Typhimurium</i>	07
Figura 4: Representación esquemática de la construcción de pLZ01	19
Figura 5: Representación esquemática de la construcción de fusiones a <i>gfp</i>	23
Figura 6: Protocolo experimental para los ensayos de transcripción	
y síntesis de componentes del T6SS _{SPI-6} de <i>S. Typhimurium</i>	
en macrófagos RAW264.7 y HD11	36
Figura 7: Protocolo experimental para los ensayos de translocación de proteínas	
bacterianas fusionadas a flagTEM1 macrófagos RAW264.7 y HD11	38
Figura 8: Protocolo experimental para los ensayos de internalización y	
supervivencia bacteriana en las líneas celulares RAW264.7 y HD11	40
Figura 9: Representación esquemática del plasmidio pLZ01	43
Figura 10: Obtención y análisis de los fragmentos de DNA	
usados para construir el plasmidio pLZ01	43
Figura 11: Confirmación de la construcción del plasmidio pLZ01 mediante PCR	44
Figura 12: Representación esquemática y confirmación de	
la construcción de fusiones transcripcionales a <i>gfp</i>	45
Figura 13: Representación esquemática y confirmación de	
la construcción de fusiones traduccionales a <i>gfp</i>	46
Figura 14: Los componentes del T6SS _{SPI-6} no se expresan en medio de cultivo celular	47
Figura 15: Detección de la transcripción de componentes del T6SS _{SPI-6}	
fusionados a <i>gfp</i> en el interior de macrófagos murinos y aviares	48

Figura 16: Presencia de expresión de componentes del T6SS _{SPI-6} de <i>S. Typhimurium</i> en el interior de macrófagos murinos.....	49
Figura 17: Presencia de expresión de componentes del T6SS _{SPI-6} de <i>S. Typhimurium</i> en el interior de macrófagos aviares.....	50
Figura 18: Detección de la síntesis de componentes del T6SS _{SPI-6} fusionados a <i>gfp</i> en el interior de macrófagos murinos y aviares.....	51
Figura 19: Presencia de síntesis de componentes del T6SS _{SPI-6} de <i>S. Typhimurium</i> en el interior de macrófagos murinos.....	52
Figura 20: Presencia de síntesis de componentes del T6SS _{SPI-6} de <i>S. Typhimurium</i> en el interior de macrófagos aviares.....	52
Figura 21: Representación esquemática del ensayo de pérdida de FRET.....	54
Figura 22: Representación esquemática de los vectores pFlagTEM1 y pVgrGFT.....	55
Figura 23: Confirmación mediante PCR de la construcción de pVgrGFT.....	56
Figura 24: Producción <i>in vitro</i> de VgrG fusionado a FlagTEM1 en transformantes de <i>E. coli</i> DH5α y <i>S. Typhimurium</i> 14028s que contienen los plasmidios pFlagTEM1 o pVgrGFT.....	57
Figura 25: Sustrato CCF2 sin hidrolizar en el interior de macrófagos murinos y aviares sin infectar.....	59
Figura 26: Translocación de SipAFT y ausencia de translocación de VgrGFT al citosol de macrofagos murinos luego de 2 h de infección.....	59
Figura 27: Translocación de SipAFT y ausencia de translocación de VgrGFT al citosol de macrofagos murinos luego de 15 h de infección.....	60
Figura 28: Translocación de SipAFT y ausencia de translocación de VgrGFT al citosol de macrofagos aviares luego de 2 h de infección.....	60
Figura 29: Translocación de SipAFT y ausencia de translocación de VgrGFT al citosol de macrofagos aviares luego de 15 h de infección.....	61
Figura 30: Cuantificación de translocación de SipAFT y ausencia de translocación de VgrGFT al citosol de macrofagos murinos, 2 h post infección.....	62
Figura 31: Cuantificación de translocación de SipAFT y ausencia de translocación de VgrGFT al citosol de macrofagos aviares, 2 h post infección.....	63
Figura 32: Representación esquemática del método de mutagénesis descrito por Datsenko y Wanner.....	65

Figura 33: Confirmación por PCR de las mutantes MTM1318 y MTM1316.....	65
Figura 34: Mutaciones del T6SS _{SPL-6} no disminuyen la supervivencia de cepas en macrófagos murinos, pero mutantes de <i>clpV</i> aumentan su internalización.....	67
Figura 35: Mutaciones del T6SS _{SPL-6} no disminuyen la supervivencia de cepas en macrófagos aviares, pero mutantes de <i>clpV</i> aumentan su internalización.....	67
Figura 36: Eliminación de <i>clpV</i> aumenta internalización de la cepa a macrófagos murinos sin disminuir su supervivencia, pero fenotipo no es complementado con pClpV.....	68
Figura 37: Eliminación de <i>clpV</i> aumenta internalización de la cepa a macrófagos aviares sin disminuir su supervivencia, pero fenotipo no es complementado con pClpV.....	68

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
AL	Agar LB
Amp	Ampicilina
APS	Persulfato de amonio
ATP	Adenosín trifosfato
pb	Pares de bases
CL	Caldo LB
Cm	Cloranfenicol
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FBS	Suero fetal de bovino
g	Gramos
gDNA	DNA genómico
GFP	Proteína Fluorescente Verde
h	Horas
Kan	Kanamicina
kb	Kilobases
kDa	KiloDalton
L	Litros
mA	Miliamperios
mcs	Sitio de multiple clonamiento
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
MOI	Multiplicidad de infección
Nal	Ácido nalidíxico
nt	Nucleótidos
°C	Grados Celsius
ORF	Marco de lectura abierto

PAGE	Electroforesis en geles de Poliacrilamida
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
SCV	Vacuola que contiene a <i>Salmonella</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico
Sp	Estreptomicina
SPI	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i>
T1SS	Sistema de Secreción Tipo 1
T2SS	Sistema de Secreción Tipo 2
T3SS	Sistema de Secreción Tipo 3
T4SS	Sistema de Secreción Tipo 4
T5SS	Sistema de Secreción Tipo 5
T6SS	Sistema de Secreción Tipo 6
Tmp	Trimetoprim
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidad enzimática
UFC	Unidades formadoras de colonias
V	Volts
WT	Wild type

RESUMEN

Los sistemas de secreción tipo VI (T6SS) corresponden a un mecanismo de interacción célula-célula ampliamente distribuido entre bacterias Gram negativo. Si bien inicialmente al T6SS se le atribuyó un papel en la virulencia de los microorganismos, estudios posteriores dieron cuenta de su versatilidad, indicando que el sistema también toma parte en relaciones mutualistas o comensales entre bacterias y eucariontes, además de relaciones de competencia interbacteriana.

Salmonella Typhimurium codifica un T6SS en la isla de patogenicidad SPI-6 (T6SS_{SPI-6}), sin embargo el rol que cumple en la patogénesis de *Salmonella* aún no ha sido aclarado. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que mutantes de este sistema presentan una menor colonización de órganos internos, tanto en ratones BALB/c como en pollos White Leghorn infectados oralmente. Considerando que los componentes celulares del sistema inmune son la principal puerta de entrada de *Salmonella* para el desarrollo de la infección sistémica, se planteó como hipótesis de este trabajo que “el Sistema de Secreción Tipo VI codificado en la isla genómica SPI-6 de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium se expresa en el interior de macrófagos de origen murino y aviar, favoreciendo la supervivencia bacteriana en estas células”. Para probar esta hipótesis el objetivo fue evidenciar la expresión, funcionalidad y contribución del T6SS durante la interacción de *S. Typhimurium* con macrófagos murinos y aviares.

Para determinar la expresión del T6SS durante la infección de macrófagos, se construyó el vector pLZ01 que permitió la generación de fusiones transcripcionales y traduccionales a la proteína fluorescente verde (GFP) en *Salmonella*, mediante recombinación homóloga de productos de PCR. De esta manera, se fusionaron componentes estructurales del T6SS_{SPI-6} (VgrG, Hcp-1, Hcp-2) a GFP y se evaluó su transcripción y traducción en ensayos de infección *in vitro* mediante microscopía de epifluorescencia. Por otra parte, para determinar si el sistema es translocado al citoplasma de macrófagos durante la infección de *S. Typhimurium*, se estudió la translocación de una fusión traduccional de VgrG a la β -lactamasa TEM1, construida en el plasmidio pFlagTEM1. La translocación de las fusiones fue determinada mediante un ensayo de pérdida de FRET de la cefalosporina CCF2, observado mediante microscopía de

epifluorescencia y cuantificado mediante fluorometría. Finalmente, para determinar la contribución del T6SS en los procesos de internalización y supervivencia en macrófagos se realizaron ensayos de protección con gentamicina. En ellos se comparó la capacidad de la cepa silvestre para invadir y sobrevivir en el interior de macrófagos, *versus* mutantes que carecen de todo el T6SS_{SPI-6} o poseen un T6SS_{SPI-6} no funcional debido a la mutación de *clpV*, ATPasa esencial para este sistema. Todos los experimentos se realizaron en líneas de macrófagos murinos (RAW264.7) y aviares (HD11), utilizando cepas derivadas de *S. Typhimurium* 14028s.

Los resultados mostraron que ninguno de los componentes estructurales estudiados (VgrG, Hcp-1, Hcp-2) del T6SS_{SPI-6} de *S. Typhimurium* se transcribe y traduce en el medio de cultivo celular, sin embargo su transcripción y traducción es gatillada al infectar tanto macrófagos murinos como aviares. A pesar de observar la transcripción y traducción de VgrG, no se detectó su translocación al citoplasma de las células infectadas. Contrariamente a lo esperado, se observó que la presencia del T6SS_{SPI-6} no contribuye a la supervivencia en el interior de macrófagos murinos o aviares, pero sí tendría una implicancia en la etapa de internalización de *Salmonella*, puesto que al utilizar mutantes con un T6SS_{SPI-6} no funcional se observó un fenotipo de mayor internalización en ambos modelos celulares.

Estos resultados permiten aceptar una parte de la hipótesis planteada, ya que el Sistema de Secreción Tipo VI codificado en la isla genómica SPI-6 de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium se expresa en el interior de macrófagos de origen murino y aviar, y rechazar una segunda parte de la hipótesis, pues este sistema no tendría un rol en la supervivencia bacteriana en estas células. No obstante, el aumento en la capacidad de internalización de mutantes del T6SS indica que el sistema tendría un rol durante la infección de los macrófagos.

SUMMARY

Role of the Type VI Secretion System coding in the genomic island SPI-6 to the mechanisms of virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Type VI Secretion Systems (T6SS) correspond to a widely distributed cell-cell interaction mechanism in Gram-negative bacteria. Although initially the T6SS was attributed a role in the virulence of microorganisms, subsequent studies realized its versatility, indicating that this system also takes part in comensal or mutualistic relationships between bacteria and eukaryotes, as well as interbacterial competition.

Salmonella Typhimurium encodes a T6SS in the pathogenicity island SPI-6 (T6SS_{SPI-6}), however the role of this island in the pathogenesis of *Salmonella* has not been clarified. Results obtained in our laboratory indicate that mutants of this system generate a phenotype of reduced colonization of internal organs, both in orally infected BALB/c mice and White Leghorn chicken. Because the initial contact of *Salmonella* with cellular components of the immune system is the main gateway for the development of systemic infection of *Salmonella*, the objective of this work was to determine the expression, functionality and contribution of the T6SS during *S. Typhimurium* interaction with murine and avian macrophages.

The vector pLZ01 was built to determine the expression of the T6SS during infection of macrophages. This plasmid enables the generation of transcriptional and translational fusions to the green fluorescent protein (GFP) reporter in *Salmonella* by homologous recombination of PCR products. In this way, structural components of the T6SS_{SPI-6} (VgrG, Hcp-1, Hcp-2) were merged to GFP and their transcription and translation were assessed by *in vitro* infection assays and epifluorescence microscopy. On the other hand, to determine whether the system is translocated to the cytoplasm of macrophages during infection of *S. Typhimurium*, translocation of VgrG was studied using a translational fusion of VgrG to the β -lactamase TEM1, built in the pFlagTEM1 plasmid. The translocation of the β -lactamase fusion was determined by processing of the CCF2/AM fluorescence substrate, detected by epifluorescence microscopy and quantified using fluorometry. Finally, gentamicin protection assays were performed to determine the contribution of the T6SS in the processes of internalization and survival in macrophages. In

these experiments, invasion and survive inside macrophages at the wild type strain was compared to a deletion mutant of the T6SS gene cluster and a mutant on the *clpV* gene, which encodes the ATPase essential for the functioning of the system, All experiments were carried out in murine (RAW264.7) and avian (HD11) macrophage cell-lines, using strains derived from the sequenced wild-type *S. Typhimurium* 14028s strain.

The results showed that none of the studied structural components (VgrG, Hcp-1, Hcp-2) of T6SS_{SPI-6} of *S. Typhimurium* are produced in cell culture media, but their transcription and translation are triggered when murine or avian macrophages are infected. Despite observing transcription and translation of VgrG, translocation of this protein into the cytoplasm of infected cells could not be detected. Contrary to expectations, it was observed that the presence of the T6SS_{SPI-6} did not contribute to *Salmonella* survival within murine or avian macrophages. However, internalization experiments showed that non-functional T6SS_{SPI-6} mutants showed a greater uptake into both cellular models.

These results indicate that the T6SS_{SPI-6} of *S. Typhimurium* is expressed during infection of murine and avian macrophages (the first part of the hypothesis is true), however it did not have an impact on the ability of *S. Typhimurium* to survive inside murine or avian macrophages (the second part of the hypothesis is false). However, the increase in the internalization of the T6SS mutants suggests a novel role for the T6SS during infection of macrophages.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Salmonella* comprende dos especies, *S. bongori* y *S. enterica*, que agrupan a más de 2500 serovares causantes de una variedad de enfermedades, como gastroenteritis, fiebres entéricas y septicemia, en el hombre y otros animales. La especie *S. enterica* se divide en seis subespecies, siendo *S. enterica* subespecie *enterica* aquella que se aísla con mayor frecuencia de casos de salmonelosis en animales de sangre caliente (Brenner *et al.*, 2000; CDC, 2008). Algunos de estos serovares se han adaptado para infectar exclusivamente a ciertos hospederos. Es el caso de *S. enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*), agente etiológico de la fiebre tifoidea, y *S. enterica* serovar Gallinarum (*S. Gallinarum*), agente etiológico de la tifoidea aviar, que infectan exclusivamente al ser humano y aves, respectivamente. Por otra parte, serovares como *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) y *S. enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) son patógenos para un amplio rango de hospederos, entre los cuales se encuentra el ser humano, animales de ganado, animales domésticos y roedores (Rabsch *et al.*, 2002). La enfermedad producida por estos serovares generalistas no depende únicamente del serovar infectante, sino que también del *background* genético del hospedero y su estado inmunológico (Galan, 1996). En el caso de humanos infectados, *S. Typhimurium* genera una salmonelosis no tifoidea que se remite al tracto gastrointestinal y que se caracteriza por diarrea, dolor abdominal y fiebre (Santos *et al.* 2009; Sivula *et al.*, 2008). En el caso de aves, *S. Typhimurium* genera una infección asintomática del tracto gastrointestinal que puede persistir durante meses, pero que presenta manifestaciones clínicas en el caso de aves recién nacidas (Chappell *et al.*, 2008; Sivula *et al.*, 2008). En cambio, la infección por *S. Typhimurium* en ratones susceptibles, como la cepa BALB/c, resulta fatal para el animal debido al desarrollo de una enfermedad sistémica similar a la fiebre tifoidea (Sivula *et al.*, 2008; Malo *et al.*, 1994).

A pesar de la gran diversidad de serovares de *Salmonella*, los casos de salmonelosis en el mundo son ocasionados principalmente por los serovares *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, por lo que estos serovares constituyen tanto un problema de salud pública, como para la producción pecuaria (Brenner *et al.*, 2000; Mead *et al.*, 1999; Vieira *et al.*, 2009).

1.1. Ciclo infeccioso y mecanismos moleculares de patogenicidad de *S. Typhimurium*

El ciclo infeccioso de los serovares de *Salmonella* involucra la acción concertada de una serie de factores que propician la adaptación e interacción con el hospedero. Éstos son comandados por la expresión diferencial de genes, muchos de los cuales forman parte de islas genómicas adquiridas durante la evolución de cada serovar (Groisman *et al.*, 1996; Groisman *et al.*, 1997). Algunos de estos genes están involucrados en la adaptación al contexto nutricional del hospedero, como genes necesarios para la biosíntesis de aminoácidos (Groisman *et al.*, 1997; Stocker *et al.*, 1983), mientras que otros otorgan ventajas para competir con la microbiota comensal, como genes involucrados en la respiración anaeróbica en el intestino (Winter *et al.*, 2010). Sin embargo, otros codifican factores que participan directamente en la interacción con el hospedero, como *clusters* de genes que codifican sistemas secretores de proteínas, siendo algunos de éstos necesarios para tomar control de las células del epitelio entérico (Galan, 1999; Gruenheid *et al.*, 2003).

El ciclo de *S. Typhimurium* comienza con el ingreso al organismo producto de la ingestión de agua o alimentos contaminados con la bacteria. Ésta es capaz de soportar el pH ácido del estómago y alcanzar la porción distal del íleon. En esta región del intestino, *S. Typhimurium* atraviesa a la cara basolateral del epitelio al tomar contacto con células M de las placas de Peyer y a través de enterocitos no fagocíticos, por mecanismos de invasión inducidos por la propia bacteria (Haraga *et al.*, 2008; Hallstrom *et al.*, 2011). La invasión del epitelio requiere de la activación de un sistema especializado en la secreción de proteínas, denominado Sistema de Secreción Tipo III (T3SS), codificado en la Isla 1 de Patogenicidad de *Salmonella* (SPI-1). Este T3SS se ensambla en la membrana de la bacteria formando un organelo denominado inyectisoma, a través del cual se inyectan proteínas efectoras al citoplasma de la célula blanco. Estos efectores provocan un reordenamiento local del citoesqueleto, modifican el tráfico vesicular y alteran vías de transducción de señales, lo que resulta en la internalización y supervivencia de la bacteria (Galan, 1999; Gruenheid *et al.*, 2003; Ly *et al.*, 2007). Posteriormente, *S. Typhimurium* escapa del epitelio y alcanza la cara basolateral donde es rápidamente fagocitada por macrófagos y células dendríticas. En ciertos hospederos ocurre una fuerte liberación de citoquinas proinflamatorias, que provoca la infiltración de polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos, responsables de la eliminación de la

bacteria (Tam *et al.*, 2008; Tsolis *et al.*, 2008). En el caso de ratones susceptibles, *S. Typhimurium* tiene la capacidad de sobrevivir en el interior de macrófagos y células epiteliales, gracias a un segundo T3SS codificado en la Isla 2 de Patogenicidad de *Salmonella* (SPI-2). La acción temprana del T3SS codificado en SPI-1 (T3SS_{SPI-1}) y la posterior acción del T3SS codificado en SPI-2 (T3SS_{SPI-2}) evitan la fusión del lisosoma al fagosoma en que se encuentra la bacteria, promoviendo la biogénesis de la “Vacuola que Contiene a *Salmonella*” (SCV), donde *S. Typhimurium* sobrevive y se replica. Esta resistencia a la actividad bactericida de macrófagos le permite a *S. Typhimurium* alcanzar los nódulos linfáticos mesentéricos del ratón y posteriormente infectar macrófagos residentes del hígado y bazo (Hensel, 2000).

1.2. Sistemas de secreción de proteínas

En bacterias Gram negativo se han reportado seis sistemas especializados en la secreción de proteínas y/o moléculas efectoras. En la patogenia de *Salmonella* ha sido principalmente descrito el T3SS. Sin embargo, los Sistemas de Secreción Tipo I (T1SS), Tipo II (T2SS) y Tipo V (T5SS) también tienen relevancia debido a su participación en el ensamblaje de un gran número de adhesinas fimbriales y no fimbriales necesarias durante la interacción con el hospedero (Wooldridge, 2009).

Como se observa en la Figura 1, los T1SS, T3SS y T4SS median el transporte de efectores a través de estructuras transperiplásmicas, permitiendo una secreción en una sola etapa. Por otra parte, los T2SS y T5SS ejecutan el transporte en dos pasos: en una primera etapa los efectores son exportados por las vías Sec o Tat al periplasma, para posteriormente ser secretados al medio extracelular por un segundo transportador localizado en la membrana externa. Las proteínas y moléculas efectoras de los sistemas de secreción cumplen roles muy variados, por lo que los sistemas se encargan de exportarlos a los compartimentos adecuados. Es así que los T1SS, T2SS y T5SS secretan sus efectores al medio extracelular, mientras que los T3SS y T4SS lo hacen hacia el citoplasma de células blanco. Entre los efectores descritos en bacterias Gram negativo encontramos enzimas como glicanasas, metaloproteasas (T1SS) ADP-ribosilasas (T2SS), homólogos de proteínas de células blanco para intervenir directamente en cascadas transduccionales y modular la respuesta del hospedero (T3SS), e incluso ácidos nucleicos (T4SS) (Desvaux *et al.*, 2004, Tseng *et al.*, 2009).

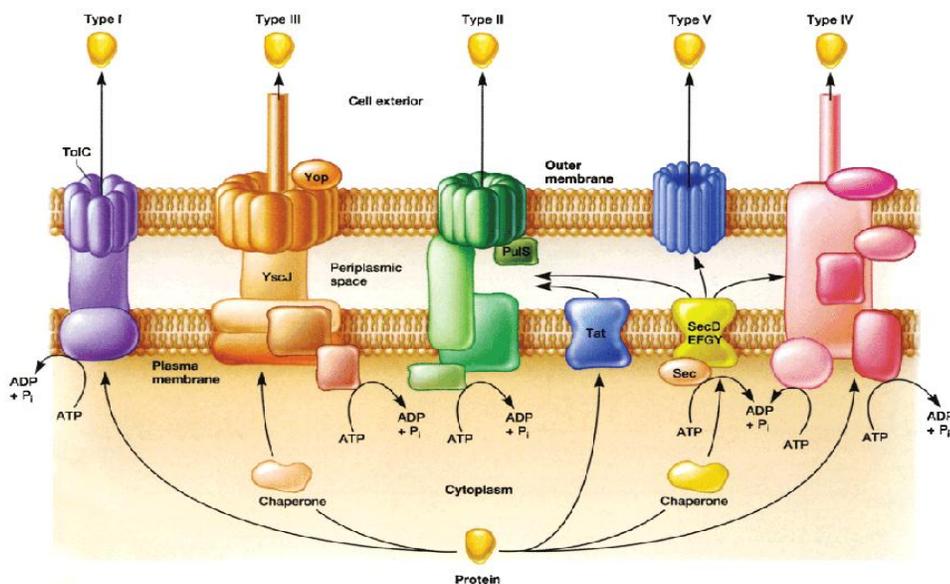


Figura 1. Representación esquemática de los Sistemas de Secreción Tipo I al V descritos en bacterias Gram negativo (Ryan *et al.*, 2010).

En estudios más recientes se ha descrito un nuevo sistema de secreción, denominado Sistema de Secreción Tipo VI (T6SS), ampliamente distribuido en bacterias Gram negativo que establecen un estrecho contacto con su hospedero. Si bien este sistema fue definido como tal en el año 2006, las primeras evidencias de su existencia se obtuvieron una década atrás, con el descubrimiento de una proteína denominada Hcp (*Haemolysin co-regulated protein*), la cual era secretada al medio de cultivo por *Vibrio cholerae* aún cuando carecía de un péptido señal en su región N-terminal (Whilliams *et al.*, 1996). Desde el reporte inicial de la secreción de Hcp, en una variedad de bacterias se identificaron islas genómicas involucradas en la secreción de proteínas homólogas a ésta, que tenían incidencia en virulencia (Bingle *et al.*, 2008). Cada una de estas islas contaba con un gen cuyo producto es un homólogo a IcmF, proteína inicialmente descrita como componente del T4SS de *Legionella pneumophila*. Por esta razón estos *clusters* de genes se denominaron IAHP (*IcmF-associated homologous protein*) (Das *et al.*, 2003). Sin embargo, posteriormente se determinó que la mayoría de los genes de estos *clusters* no codificaba componentes del T4SS, ni de otros sistemas de secreción descritos, sugiriendo que los IAHPs codificaban componentes de una nueva maquinaria de secreción definida como T6SS (Pukatzki *et al.*, 2006).

1.3. Sistema de secreción tipo VI: Organización genética y estructura

La organización variable de los *clusters* IAHP en los genomas bacterianos ha dificultado la identificación de los T6SS. Análisis *in silico* muestran que los *clusters* que codifican T6SS serían muy ubicuos entre bacterias Gram negativo y que pueden ser agrupados en cuatro grandes ramas filogenéticas (Bingle *et al.*, 2008, Cascales, 2008). Actualmente se han identificado trece proteínas conservadas que constituirían el *core* del T6SS, además de un grupo de proteínas accesorias ampliamente distribuidas entre los *clusters* que codifican T6SS, las que incluirían reguladores transcripcionales y post-transcripcionales de la actividad del sistema (Boyer *et al.*, 2009). Gracias al estudio de diversos componentes conservados como ClpV, VipA, VipB, IcmF, DotU, Hcp, VgrG y gp25-like, se ha llegado a la construcción de los actuales modelos del T6SS y su posible rol en esta compleja maquinaria (Figura 2).

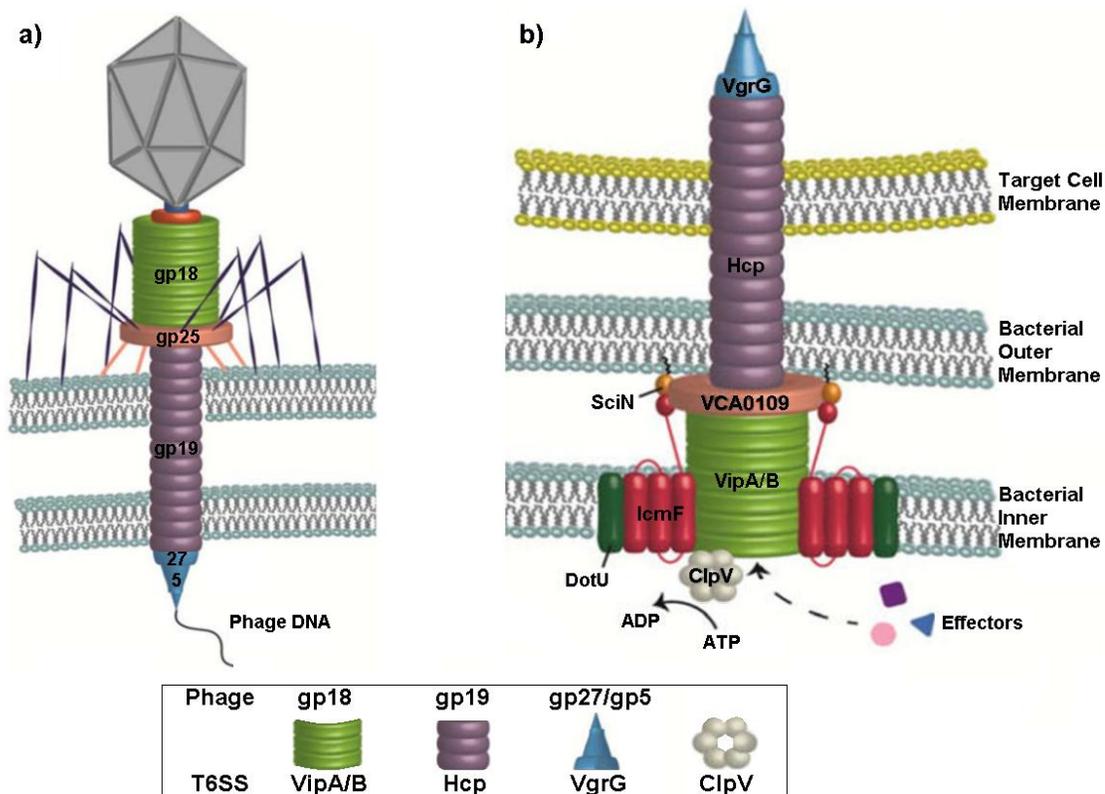


Figura 2. Representación esquemática del Sistema de Secreción Tipo VI: (a) Maquinaria de inyección del fago T4. (b) Modelo del T6SS en bacterias Gram negativo. (Records, 2011).

El análisis cristalográfico de la proteína Hcp1 de *Pseudomonas aeruginosa* indica que ésta oligomeriza formando anillos hexaméricos. Esta evidencia, sumada a la similitud estructural de Hcp con la proteína gpV de la cola del bacteriófago λ , que genera un tubo de anillos hexaméricos de similares características, sugirió la presencia de un tubo central en el T6SS formado por Hcp (Mougous *et al.*, 2006, Pell *et al.*, 2009). Por otra parte, del análisis de trímeros de la proteína VgrG se encontraron regiones conservadas y homólogas a trímeros de las proteínas gp5 y gp27, las cuales constituyen la punta del complejo aguja del bacteriófago T4. Esto sugirió que Hcp y VgrG generaban una estructura similar al complejo aguja, donde VgrG toma contacto directo con la membrana de la célula blanco (Pukatzki *et al.*, 2007). Además, se observó que las proteínas VipA y VipB del T6SS oligomerizan formando túbulos capaces de recubrir el tubo central formado por Hcp. La estructura y dimensiones de VipA y VipB resultaron ser semejantes a la vaina contráctil de la cola del bacteriófago T4, actividad que posteriormente también fue comprobada (Leiman *et al.*, 2009, Pell *et al.*, 2009, Basler *et al.*, 2012). Esto indica que el T6SS compartiría un origen evolutivo con la maquinaria de inyección de bacteriófagos (Figura 2). Las proteínas IcmF y DotU inicialmente fueron estudiadas en el contexto del T4SS, donde se demostró que eran necesarias para la funcionalidad del sistema. Esto se debería a que estas proteínas se localizarían en la membrana interna de la bacteria, estabilizando la maquinaria secretora a través de un anclaje al peptidoglicán y la membrana (Sexton *et al.*, 2004, Aschtgen *et al.*, 2010). Finalmente, la proteína ClpV pertenece a la superfamilia de proteínas Clp/hsp100 AAA+ (*ATPases associated with various cellular activities*). Inicialmente se postuló que esta proteína energizaba el proceso de secreción del T6SS, pues al mutar *clpV* se perdía la capacidad de secretar Hcp y VgrG al medio de cultivo en *Vibrio cholera* (Shilieker *et al.*, 2005; Mougous *et al.*, 2006). Sin embargo, posteriormente se demostró que hexámeros de esta proteína interactúan con túbulos formados por las proteínas VipA y VipB, desensamblándolos (Bönemann *et al.*, 2009). Esta actividad sería necesaria pues al contraerse el túbulo de VipA y VipB, el tubo formado por Hcp y VgrG es eyectado hacia una célula blanco y ClpV restablece el sistema al disgregar la vaina de VipA y VipB contraída (Basler & Mekalanos, 2012).

1.4. Sistema de Secreción Tipo VI en *Salmonella*

El análisis bioinformático de secuencias genómicas de distintos serovares del género *Salmonella* ha permitido la identificación de 5 *clusters* que codifican los componentes *core* del T6SS. Estos *clusters* se encuentran en islas genómicas distribuidas diferencialmente entre los distintos serovares del género. El análisis filogenético de dichos sistemas los agrupó en cada una de las cuatro ramas descritas en trabajos previos (Blondel et al., 2009, Bingle et al., 2008). Estos resultados sugieren que los T6SS de *Salmonella* fueron adquiridos por eventos independientes de transferencia horizontal durante la evolución para contribuir a la virulencia y/o adaptación a diversos ambientes u hospederos.

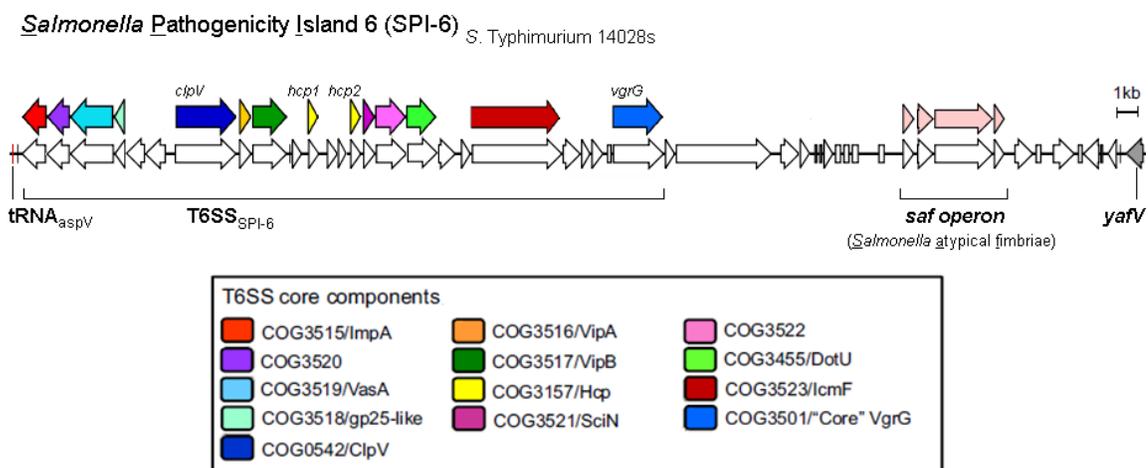


Figura 3. Representación esquemática del T6SS codificado en SPI-6 (T6SS_{SPI-6}) identificado en *S. Typhimurium*. Los ORF son representados como flechas que indican el sentido de su transcripción. Los componentes *core* y accesorios conservados por el sistema son representados con diferente color (adaptado de Blondel *et al.*, 2009).

Salmonella Typhimurium posee un único T6SS codificado en la Isla 6 de Patogenicidad de *Salmonella* (SPI-6), previamente conocida como SCI (*Salmonella enterica* centisome 7 genomic island), localizada entre el gen del tRNA *aspV* y el gen de la hidrolasa *yafV* (Figura 3). Esta isla se encontró en 16 de los 24 serovares de *Salmonella* analizados por Blondel *et al.* (2009), y presenta tamaños que varían entre ~35 y 50 kb dependiendo del serovar. Análisis del contenido de C+G en la isla indican que éste no es homogéneo, pudiéndose identificar una región de menor

contenido de C+G que incluye al operón fimbrial (*saf*), los reguladores *sinB* y *sinR* y la invasina *pagN*. Río arriba del operón fimbrial se encuentra una región de mayor contenido de C+G, la que contiene numerosos ORF que codifican proteínas de membrana interna, externa y periplasma, el cual se identificó originalmente como un *cluster* IAHP (Folkesson *et al.*, 2002, Das *et al.*, 2003).

1.5. Participación del Sistema de Secreción tipo VI en la virulencia de *S. Typhimurium*

Diferentes reportes de la literatura han demostrado muy variadas funciones para los distintos T6SS. Por ejemplo, en *V. cholerae* y *L. pneumophila* se ha observado la participación del T6SS en mecanismos de citotoxicidad dependientes de contacto frente a macrófagos murinos y otras células fagocíticas (Bingle *et al.*, 2008, Pukatzki *et al.*, 2006). Además, el T6SS de *V. cholerae* ha sido vinculado a propiedades antimicrobianas que participarían en competencias interespecie en determinados ecosistemas (MacIntyre *et al.*, 2010). Esta hipótesis ya ha sido comprobada en otros organismos como *Pseudomonas aeruginosa*, donde el T6SS translocaría al periplasma de otras bacterias efectores bacteriolíticos encargados de la degradación del peptidoglicán (Russell *et al.*, 2011).

Los estudios realizados acerca de la contribución a la virulencia del T6SS_{SPI-6} de *S. Typhimurium* entregan información contradictoria y difícilmente comparable debido a los distintos modelos experimentales utilizados. Se ha reportado que una delección completa de SPI-6 resulta en una disminución en la capacidad invasiva de *S. Typhimurium* a células epiteliales (Folkesson *et al.*, 2002). Sin embargo, es posible que la delección del operón fimbrial *saf* sea responsable de este fenotipo. En otro reporte se determinó que mutantes por inserción de un transposón en los genes *STM0272* y *STM0291*, pertenecientes a T6SS_{SPI-6}, causaban una reducción cercana al 30% en la capacidad de *S. Typhimurium* para replicarse dentro de macrófagos murinos (Klumpp *et al.*, 2007). *STM0272* y *STM0291* codifican una proteína de la familia RHS y una proteína con homología a ClpV, respectivamente. Como se mencionó anteriormente, la proteína ClpV es necesaria para el funcionamiento del T6SS debido al rol que cumple en la disgregación de los túbulos contraídos de VipA y VipB (Mougous *et al.*, 2006, Basler & Mekalanos, 2012). Además, se ha observado que la sobreexpresión de una proteína ClpV dominante negativa, reduce la capacidad de *S. Typhimurium* de invadir células epiteliales

(Schlieker *et al.*, 2005). Contrariamente a estos reportes, otro trabajo indicó que una mutante de *S. Typhimurium* en *sciS*, gen presente en T6SS_{SPI-6} que codifica una proteína homóloga a IcmF, otorga un fenotipo de hipervirulencia en macrófagos y en un modelo murino de infección (Parson *et al.*, 2005).

Por otra parte, trabajos realizados recientemente han indicado que el T6SS_{SPI-6} de *S. Typhi* tiene una incidencia en su virulencia. Mediante el uso de mutantes por inserción de un transposón en una cepa de *S. Typhi*, se observó que aquellas que poseían inserciones en SPI-6 presentaban un fenotipo atenuado de virulencia en un nuevo modelo ratones humanizados infectados intraperitonealmente (Libby *et al.*, 2010). Esto, a pesar que se suponía que este sistema era no funcional debido a la presencia de pseudogenes codificados en el T6SS_{SPI-6} de *S. Typhi*. En apoyo al trabajo de Libby y colaboradores, recientemente se reportó que Hcp de *S. Typhi* es secretada al medio de cultivo, proceso que es dependiente de componentes esenciales del T6SS como ClpV (Wang *et al.*, 2011).

Recientemente Mulder y colaboradores analizaron mutantes de distintos componentes del T6SS_{SPI-6} de *S. Typhimurium* y observaron que el sistema contribuía en la colonización de órganos internos en el modelo murino (Mulder *et al.*, 2012). Estos fenotipos atenuados han sido reproducidos en nuestro laboratorio en ensayos de competencia entre *S. Typhimurium* 14028s y mutantes de *clpV* y del *cluster* completo del T6SS_{SPI-6}, utilizando modelos de infección murino y aviar. Estos últimos antecedentes sugieren una posible función del T6SS_{SPI-6} de *S. Typhimurium* durante la interacción con componentes celulares del sistema inmunológico del hospedero, etapa fundamental para el establecimiento de la infección sistémica y colonización de órganos blandos.

Considerando los fenotipos observados *in vivo* tanto en ratón como en aves, el estudio de la infección de macrófagos provenientes de ambos modelos puede entregar información relevante respecto al rol del T6SS_{SPI-6} de *S. Typhimurium* durante la infección. Es importante destacar que el estudio de la interacción entre microorganismos y células fagocíticas se han observado diversos fenotipos como cambios morfológicos, alteración de los patrones de presentación de antígenos, variaciones en la secreción de citoquinas y cambios en la viabilidad celular, entre otros. Muchos de estos cambios tienen incidencia en la supervivencia bacteriana en el interior de

macrófagos. Dada la importancia de la interacción entre *S. Typhimurium* y macrófagos, en esta tesis se analizó la expresión de los componentes de T6SS y su efecto en la supervivencia bacteriana al interior de macrófagos de dos especies modelo.

Por lo tanto, de acuerdo a los antecedentes descritos, en este trabajo se propone la siguiente **Hipótesis**:

El Sistema de Secreción Tipo VI codificado en la isla genómica SPI-6 de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium se expresa en el interior de macrófagos de origen murino y aviar, favoreciendo la supervivencia bacteriana en estas células.

En esta Tesis se planteó como **Objetivo General** determinar la expresión de componentes del Sistema de Secreción Tipo VI codificado en la isla genómica SPI-6 de *S. Typhimurium* en el interior de macrófagos y evaluar su relevancia en la supervivencia intracelular en macrófagos de origen murino y aviar.

Los **Objetivos Específicos** fueron:

1. Evaluar la síntesis de proteínas que son componentes conservados del T6SS codificado en SPI-6 de *S. Typhimurium*, en el interior de los macrófagos.
2. Determinar la translocación de componentes del T6SS codificado en SPI-6 de *S. Typhimurium* al interior de los macrófagos.
3. Determinar la contribución del T6SS codificado en SPI-6 a la supervivencia de *S. Typhimurium* en macrófagos RAW264.7 y HD11.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Reactivos

De Fermentas (Hanover, MD, EEUU) se obtuvo: Estándares de peso molecular GeneRuler de 100pb y 1kb, enzimas de restricción *NdeI*, *XhoI* y *DpnI* con sus respectivos *tampones*.

De Gibco BRL (Grand Island, NY, EEUU) se obtuvo: Dodecilsulfato de sodio (SDS), Tris-HCl, acrilamida, bisacrilamida, bromuro de etidio, agarosa.

De Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, EEUU) se obtuvo: Todos lo oligonucleótidos utilizados en esta tesis.

De Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EEUU) se obtuvo: Solución 0,4% Azul de Tripán, medio de montaje ProLong[®] Gold antifade con DAPI, sistema comercial LiveBLAzer[™] FRET-B/G con CCF2-AM y CCF4-AM.

De Merck Química Chilena Soc. Ltda. (Santiago, Chile) se obtuvo: Cloruro de sodio, glicerol, ácido clorhídrico, isopropanol, formaldehído, acetato de sodio, etanol absoluto.

De Nunc International (Rochester, NY, EEUU) se obtuvo: Placas desechables de 6 y 48 pocillos para cultivo celular.

De Omega Bio-Tek (Doraville, GA, EEUU) se obtuvo: Sistema comercial de extracción plasmidial E.Z.N.A Plasmid Miniprep II.

De Promega (Madison, WI, EEUU): Go-Taq DNA Polimerasa, dNTPs, enzima de restricción *SacII* con sus respectivos *tampones*, sistema comercial Wizard SV GEL and PCR Clean-Up.

De Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU) se obtuvo: Kanamicina, ampicilina, cloranfenicol, arabinosa, β -mercaptoetanol, azul de bromofenol, persulfato de amonio (APS), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED), tricina, ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA), filtros Millipore 0,025 μ m.

De Statagene (La Jolla, CA, EEUU) se obtuvo: Anticuerpo primario ANTI-FLAG[®] M2 (#200471).

De Thermo Scientific HyClone (Waltham, MA, EEUU) se obtuvo: Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, high glucose), suero fetal bovino (FBS), PBS 10x, sistema comercial SuperSignal West-Pico, película de exposición CL-XPosure, anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa (#32430).

De Winkler Ltda. (Santiago, Chile) se obtuvo: Seroalbúmina bovina.

2.2. Cepas bacterianas

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en la presente tesis.

Cepa	Genotipo/Fenotipo relevante	Fuente o referencia
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk ⁻ , mk ⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ , Nal ^R	Stock del laboratorio
DH5 α λ pir	F Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk ⁻ , mk ⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ ⁺ pir, Nal ^R	Stock del laboratorio
DH5 α /pFlagTEM1	DH5 α /pFlagTEM1, Cm ^R Nal ^R	Este trabajo
DH5 α /pVgrGFT	DH5 α /pVgrGFT, Cm ^R Nal ^R	Este trabajo
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium		
14028s	<i>S. Typhimurium</i> 14028s, cepa silvestre	Stock del laboratorio
14028s/pFlagTEM1	14028s/pFlagTEM1, Cm ^R	Este trabajo
14028s/pSipAFT	14028s/pSipAFT, Cm ^R	Este trabajo
14028s/pVgrGFT	14028s/pVgrGFT, Cm ^R	Este trabajo
14028s/pWSK29	14028s/pWSK29, Amp ^R	Este trabajo
MTM1300	14028s con la fusión traduccional STM14_0338-gfpmut3 FRT cat FRT, Cm ^R	Este trabajo

Cepa	Genotipo/Fenotipo relevante	Fuente o referencia
MTM1302/pmCherry	14028s con la fusión traduccional <i>STM14_0338-gfpmut3</i> FRT/pmCherry, Amp ^R	Este trabajo
MTM1303	14028s con la fusión traduccional <i>ssaG-gfpmut3</i> FRT <i>cat</i> FRT, Cm ^R	Este trabajo
MTM1305/pmCherry	14028s con la fusión traduccional <i>ssaG-gfpmut3</i> FRT/pmCherry, Amp ^R	Este trabajo
MTM1306	14028s con la fusión transcripcional <i>STM14_0338::gfpmut3</i> FRT <i>cat</i> FRT, Cm ^R	Este trabajo
MTM1308/pmCherry	14028s con la fusión transcripcional <i>STM14_0338::gfpmut3</i> FRT/pmCherry, Amp ^R	Este trabajo
MTM1309	14028s con la fusión transcripcional <i>STM14_0324::gfpmut3</i> FRT <i>cat</i> FRT, Cm ^R	Este trabajo
MTM1311/pmCherry	14028s con la fusión transcripcional <i>STM14_0324::gfpmut3</i> FRT/pmCherry, Amp ^R	Este trabajo
MTM1312	14028s con la fusión transcripcional <i>STM14_0327::gfpmut3</i> FRT <i>cat</i> FRT, Cm ^R	Este trabajo
MTM1314/pmCherry	14028s con la fusión transcripcional <i>STM14_0327::gfpmut3</i> FRT/pmCherry, Amp ^R	Este trabajo
MTM1315	14028s Δ <i>SPI-1::aph</i> , Kan ^R	Este trabajo
MTM1315/pSipAFT	MTM1315/pSipAFT, Cm ^R Kan ^R	Este trabajo
MTM1316	14028s Δ <i>SPI-6::aph</i> , Kan ^R	Este trabajo
MTM1317	14028s Δ <i>SPI-6::FRT</i>	Este trabajo
MTM1318	14028s Δ <i>clpV::cat</i> , Cm ^R	Este trabajo
MTM1319	14028s Δ <i>clpV::FRT</i>	Este trabajo
MTM1319/pClpV	MTM1319/pClpV, Amp ^R	Este trabajo
MTM1319/pClpV/ pVgrGFT	MTM1319/pClpV/pVgrGFT, Amp ^R , Cm ^R	Este trabajo
MTM1319/pWSK29/ pVgrGFT	MTM1319/pWSK29/pVgrGFT, Amp ^R Cm ^R	Este trabajo
MTM1319/pWSK29	MTM1319/pWSK29, Amp ^R	Este trabajo
MTM1320	14028s Δ <i>aroA::aph</i> , Kan ^R	Este trabajo
MTM1321	14028s Δ <i>aroA::FRT</i>	Este trabajo
MTM1321/pWSK29	MTM1321/pWSK29, Amp ^R	Este trabajo

2.3. Plasmidios

Tabla 2. Plasmidios utilizados en la presente tesis.

Plasmidio	Características	Fuente o referencia
p3174	<i>bla</i> FRT <i>aph</i> FRT <i>gfpmut3</i> pBR322 ori, Amp ^R , Kan ^R	Gerlach <i>et al.</i> , 2007
pCLF2	<i>bla</i> FRT <i>cat</i> FRT ori _{R6K} , Amp ^R , Cm ^R	Stock de laboratorio
pCLF3	<i>bla</i> FRT <i>cat</i> FRT ori _{R6K} , Amp ^R , Cm ^R	Stock de laboratorio
pCLF4	<i>bla</i> FRT <i>aph</i> FRT ori _{R6K} , Amp ^R , Kan ^R	Stock de laboratorio
pLZ01	<i>bla</i> FRT <i>cat</i> FRT <i>gfpmut3</i> ori _{R6K} , Amp ^R , Cm ^R	Este trabajo
pKD46	<i>bla</i> P _{BAD} <i>bet</i> <i>exo</i> pSC101 oriT ^S , Amp ^R	Datsenko y Wanner, 2000
pCP20	<i>bla</i> <i>cat</i> cI857 IPR <i>flp</i> pSC101 oriT ^S , Amp ^R , Cm ^R	Datsenko y Wanner, 2000
pmCherry	Vector que expresa constitutivamente la proteína mCherry, Amp ^R	Stock de laboratorio
pFlagTEM1	<i>cat</i> P _{trc} <i>3xFlag-β-lactamasa TEM-1</i> , Cm ^R	Raffatelli <i>et al.</i> , 2005
pVgrGFT	<i>cat</i> P _{trc} <i>3xFlag-vgrG-β-lactamasa TEM-1</i> , Cm ^R	Este trabajo
pSipAFT	<i>cat</i> P _{trc} <i>3xFlag-sipA-β-lactamasa TEM-1</i> , Cm ^R	Raffatelli <i>et al.</i> , 2005
pWSK29	Vector de expresión de bajo número de copia, Amp ^R	Wang y Kushner, 1991
pClpV	pWSK29:: <i>clpV</i> , Amp ^R	Stock de laboratorio

2.4. Partidores

Tabla 3. Partidores utilizados en la presente tesis.

Nombre	Secuencia*
Construcción de pLZ01	
M13F	GTAAAACGACGGCCAGT
M13R	GGAAACAGCTATGACCATG
C3	CAGCTGAACGGTCTGGTTATAGG
XhoI_P2	CCGCTCGAGCGGCATATGAATATCCTCCTTAG
SacII_CLF3_LZ	TCCC CGCGGGATTCTGTGTC ACTCAA AATT
Generación de fusiones transcripcionales y traduccionales	
VgrG_GFtd_14028fw	CGTAACCGCCGATGATATTGCCCCCTTCTCACCTCTGA G AGTAAAGGAGAAGA AACTTTTC
VgrG_14028rv	CGGTATGGTTCGATCCATGAGAACTCCAGGTTTAATTCA GA CGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
VgrG_GFts_14028fw	TTAATCCGGTATTAAGGAGTCACTACCATGAGTTTTGT ATAAGGAGGCTGTC ATGAGTAAAGGAGAAGA AACTTTTC
P1_inv	GAAGCAGCTCCAGCCTACAC
VgrG_SPI6_Out5_check	TACCAGCGATGTCATGCAAC
VgrG- FoK1R_bpts	GTTCATTGCCCTCCAGGATA

Nombre	Secuencia*
GFP-LZ01-Check-Rev	AGGTAGTTTTCCAGTAGTGC
8_T6SS_SPI6_for	AAAGCACCGGTGAATGTGGCTG
HCP0324_GFPts_14028fw	TTAAGTAAACTTAATAAGGATATAAAAATGGCTTATG ACTAAGGAGGCTGTC <i>ATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTC</i>
HCP0324_14028rv	AAAACCAGCCAGACATAACATCTGGCCGAAAAACAG CCG <i>GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</i>
4_T6SS_SPI6_REV	TAAGCACTGGCCGTAGCTCTGG
HCP0327_GFPts_14028fw	AATTTAGGTAGTAAAAGGATAGTAGATATGTCCTTATG ACTAAGGAGGCTGTC <i>ATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTC</i>
HCP0327_14028rv	TAAATCCGGCCAGATATAAATCTGGCCGAAAAACAGC CG <i>GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</i>
HCP0327_rev	GACCAGTAATCAGCTGTCGTGAAA
SsaG_GFP_Fw	GTATCCTTACGATGTATTTATTTAAGGAAAAGCATTAT G <i>AGTAAAGGAGAAGAACTTTT</i>
SsaG_GFP_Rev	ATTTCCAGCAGCAACCGTCGAACATCGTCGCTAATAAC T <i>CGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</i>
pssaG_out5	ATAGCATTAAACAGTGCTAAG
Construcción de pVgrGFT	
NdeI_VgrG_SPI6_Dub_Tm14_Fwd	GGAATTCATATGAGTTTTGTATCCACAAA
XhoI_VgrG_SPI6_Tm14_rev	CCGCTCGAGCTCAGAGGTGAGAAGGGG
flagtem_MCS_out5	TGTTGCCCGTCTCACTGGTG
flagtem_MCS_out3	CCACTCGTGCACCCAAGTGA
Mutagénesis	
SPI-6_T6SS_(H1+P1)	AGGGTGTTTTTATACATCCTGTGAAGTAAAAAAACCG TA <i>GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</i>
SPI-6_T6SS_(H2+P2)	GTGAACATGGCACATTAATTTGAAGCAGCTCTCATCCG GT <i>CATATGAATATCCTCCTTAG</i>
SPI-6_OUT5	CCGAAGTGTATCTGGCGATGA
K1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT
STM0272_(H1+P1)	GGCATAACACATGGAAACTCCTGTTTCACGCAGTGCGT TG <i>GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</i>
STM0272_(H2+P2)	ACGGCCGGTTTCAGCAAACGATCTCAAAAACAATCTGC TC <i>CATATGAATATCCTCCTTAG</i>
STM0272_OUT5	GGCGGCAGTAAATACGATGT

* En itálica se indican las zonas de apareamiento para generar productos de PCR a partir de los plasmidios pLZ01, pCLF2 y pCLF4. Las secuencias subrayadas indican sitios de restricción de las enzimas *XhoI*, *SacII* y *NdeI*.

2.5. Medios y condiciones de cultivo bacteriano

Las bacterias se cultivaron rutinariamente a 37°C en forma aeróbica en medio LB (CL, triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 5 g/L). Los cultivos en medio sólido (AL) se realizaron en el mismo medio base conteniendo además 15g/L de agar-agar. Aquellas cepas que poseen plasmidios de replicación termosensible (pKD46 y pCP20) se incubaron a 30°C. Cuando fue necesario eliminar estos plasmidios, las cepas se cultivaron sin antibiótico a una temperatura no permisiva (42°C).

Todos los cultivos bacterianos utilizados para la infección de macrófagos se cultivaron en condiciones inductoras del T3SS de SPI-1 (Mizusaki *et al.*, 2008). Para esto, se realizaron cultivos estáticos a 37°C en CL suplementado con 300 mM NaCl sembrados en una dilución 1:100 a partir de un pre inóculo en fase estacionaria cultivado en las mismas condiciones.

Los antibióticos se utilizaron a las siguientes concentraciones finales: ampicilina 100 µg/mL, kanamicina 50 µg/mL, cloranfenicol 20 µg/mL, ácido nalidíxico 15 µg/mL.

2.6. Técnicas básicas de biología molecular

2.6.1. Extracción de DNA cromosomal

Las cepas se cultivaron en 5 mL de CL suplementadas con el antibiótico correspondiente durante toda la noche con agitación a 37°C. Luego se extrajo DNA cromosomal utilizando el sistema comercial Genelute Bacterial Genomic DNA (Sigma), según las indicaciones del fabricante. El material extraído se mantuvo a -20°C.

2.6.2. Extracción de DNA plasmidial

Se extrajeron los plasmidios pKD46, pCP20, pCLF3, pLZ01, pWSK29, pClpV, pFlagTEM1, pSipAFT y pVgrGFT a partir de las cepas descritas en la Tabla 1. Las cepas se cultivaron en 5 mL de CL suplementadas con el antibiótico correspondiente durante toda la noche con agitación a 30°C o 37°C, según corresponda. Luego, se extrajeron los plasmidios

utilizando el sistema comercial E.Z.N.A Plasmid Miniprep II, de Omega Bio-Tek, según las indicaciones del fabricante. El DNA plasmidial se eluyó con 60 μ L y se mantuvo a -20°C .

2.6.3. Purificación de DNA de reacciones de PCR y digestiones

Los productos de PCR se purificaron utilizando el sistema comercial Wizard SV GEL and PCR Clean-UP System, de Promega. Aquellos fragmentos de DNA generados por la digestión con enzimas de restricción se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa. Luego de la tinción con bromuro de etidio o Gel Red, se cortaron del gel las bandas de DNA a purificar, las cuales fueron pesadas y luego procesadas siguiendo las instrucciones del sistema comercial Wizard SV GEL and PCR Clean-UP System, de Promega.

2.6.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Los geles se prepararon usando agarosa a concentraciones entre 0,7% y 2% p/v en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). Las muestras de DNA se mezclaron con 1/6 de volumen con tampón de carga pre teñido 6X (15% Ficoll-400, 66 mM EDTA, 0,102% SDS, 0,09% azul de bromofenol, 19,8 mM Tris-HCl pH 8,0) antes de ser cargadas en el gel. Las electroforesis se realizaron a 70 V constantes y luego los geles se tiñeron por 15 min en soluciones de bromuro de etidio (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o GelRedTM 3X (Biotium). Las bandas de DNA se visualizaron y fotografiaron sobre un transiluminador UV, utilizando una cámara digital (Vilber Lourmat).

2.6.5. Transformación de bacterias con plasmidios o productos de PCR

Para transformar una cepa bacteriana, se prepararon células electrocompetentes: las bacterias se cultivaron a 37°C (30°C cuando las cepas contenían el plasmidio termosensible pKD46) en CL con agitación hasta alcanzar una DO_{600} de 0,6. Se centrifugó el cultivo a $13.000 \times g$, se descartó el sobrenadante y las bacterias sedimentadas fueron resuspendidas en 800 μL de agua destilada estéril fría. Se centrifugó nuevamente a $13.000 \times g$, se descartó el sobrenadante y se repitió el mismo procedimiento 6 veces. Finalmente, las células se resuspendieron en 500 μL de agua destilada estéril. Se mezclaron 50 o 80 μL de células

electrocompetentes con 3 μL de DNA plasmidial o 15 μL de productos de PCR, respectivamente, previamente dializado en filtros de nitrocelulosa de 0,025 μm (Millipore) y se electrotransformó en un electroporador “*E. coli* Puler™” (Bio-Rad) a un voltaje de 1,8 kV. Inmediatamente después de electroporar, se agregó 1 mL de CL y se incubó a 30° o 37°C por 2 h. Una vez transcurrido este tiempo, las células transformadas se sembraron en AL suplementada con los antibióticos correspondientes y se incubó toda la noche a 30° o 37°C dependiendo del producto transformado. Finalmente, se seleccionaron los clones mediante la resistencia otorgada por el material transformado.

2.6.6. PCR de colonias

Para la verificación de los plasmidios recombinantes, se realizaron reacciones de PCR a partir de una suspensión bacteriana (parte de la colonia resuspendida en 100 μL de agua destilada estéril), utilizando la mezcla de reacción y el programa de PCR presentado a continuación:

Reacción de PCR (20 μL)			Programa de PCR		
Componentes de la reacción	Volumen	Concentración	T°	Tiempo	Ciclos
Suspensión bacteriana	2 μL		98°C	10 min	1 ciclo
Partidor 1 [10 μM]	0,4 μL	0,2 μM	98°C	30 s	30 ciclos
Partidor 2 [10 μM]	0,4 μL	0,2 μM	55°C	30 s	
dNTPs [10 mM c/u]	0,4 μL	0,2 mM	72°C	1 min/kb	
MgCl ₂ [25 mM]	1,6 μL	2 mM	72°C	10 min	1 ciclo
Tampón 5X Go-Taq Flexi	4 μL	1X			
Go-Taq polimerasa [5 U/ μL]	0,1 μL	0,5 U/reacción			
Agua	11,1 μL		4°C	∞	-

2.7. Construcción del plasmidio pLZ01

La construcción de pLZ01 busca generar un plasmidio incapaz de replicarse en *Salmonella* y que posea el marco de lectura del gen reportero *gfp*. Este plasmidio será utilizado como templado en la generación de los productos de PCR necesarios para la construcción de fusiones transcripcionales y traduccionales al reportero GFP. Para ello, se clonó el marco de lectura de *gfpmut3* en el plasmidio pCLF3, el cual requiere de la proteína Pi para su replicación. Debido a que esta proteína está ausente en un gran número de serovares de *Salmonella*, el

plasmidio pLZ01 no se replica en ella, reduciendo drásticamente el número de falsos positivos al momento de la mutagénesis, convirtiéndolo en el templado más adecuado para la generación de productos de PCR para una posterior fusión de genes mediante recombinación homóloga. En la Figura 4 se muestra un esquema de la construcción del plasmidio pLZ01.

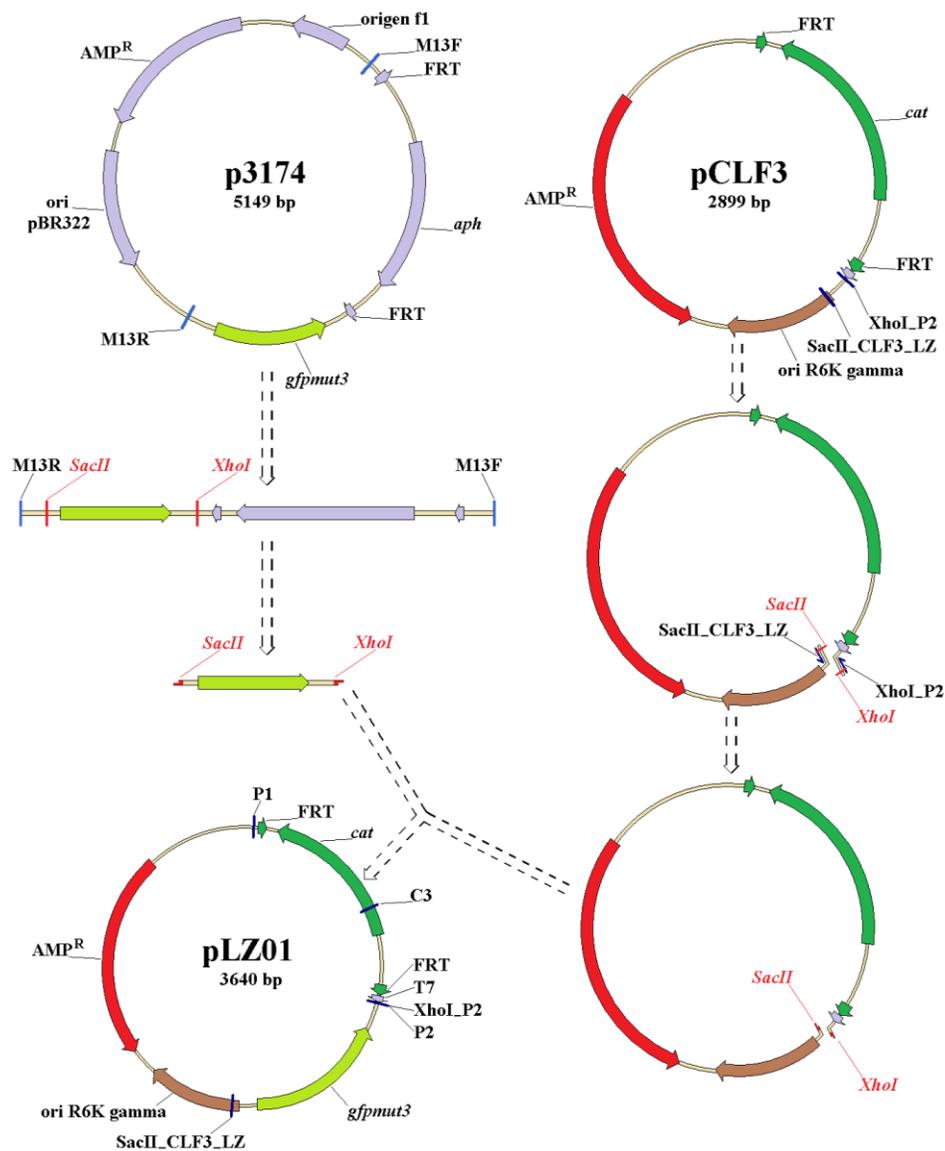


Figura 4. Representación esquemática de la construcción de pLZ01. En la figura se muestran las etapas del clonamiento en pCLF3 de *gfpmut3* codificado en p3174.

2.7.1. Aislamiento y purificación del marco de lectura abierto del reportero GFP

Se amplificó mediante PCR el ORF del gen de la proteína fluorescente verde (*gfpmut3*) a partir del plasmidio p3174 (Tabla 2), con los partidores M13F y M13R (Tabla 3), utilizando la reacción descrita a continuación:

Reacción de PCR (75 μ L)			Programa de PCR		
Componentes de la reacción	Volumen	Concentración	T°	Tiempo	Ciclos
DNA plasmidial: p3174	1,5 μ L	-	94°C	5 min	1 ciclo
Partidor directo [10 μ M]	2,25 μ L	0,3 μ M	98°C	20 s	25 ciclos
Partidor inverso [10 μ M]	2,25 μ L	0,3 μ M	55°C	20 s	
dNTPs [10 mM c/u]	2,25 μ L	0,3 mM	72°C	1,5 min	1 ciclo
Tampón 5X KAPA HiFi Fidelity	15 μ L	1X	72°C	5 min	
KAPA HiFi DNA pol. [1 U/ μ L]	1,5 μ L	0,5 U/reacción	4°C	∞	-
Agua	50,25 μ L	-			

Se obtuvo un producto de PCR de ~2,4 kb, el cual contiene el ORF de *gfpmut3* y un *cassette* de resistencia a antibiótico que codifica el gen *aph* (aminoglicósido fosfotransferasa; resistencia a Kan). Este producto fue purificado como se indica en la Sección 2.6.3, obteniendo 70 μ L de producto.

Los sitios de restricción de las endonucleasas *SacII* y *XhoI* que flanquean el ORF de *gfpmut3* 46 pb río arriba y 22 pb río abajo, respectivamente, fueron utilizados para liberarlo desde el producto de amplificación. Para ello, 70 μ L del producto fueron digeridos con 4,12 μ L de la enzima *XhoI* (10 U/ μ L), en un medio con 8,24 μ L de tampón R 10X (100 mM Tris HCl, 100 mM MgCl₂, 1000 mM KCl, 1 mg/ml BSA, pH 8,5), a 37°C durante toda la noche. Los dos fragmentos generados con esta reacción (~860 pb correspondientes al ORF de *gfpmut3* y ~1530 pb correspondientes al resto del producto de PCR) fueron separados en un gel de agarosa 1,5% p/v y se aisló desde el gel la banda de menor tamaño, de acuerdo a lo descrito en la Sección 2.6.3, obteniendo 40 μ L de producto. Posteriormente, los 40 μ L obtenidos fueron digeridos con 1,16 μ L de la enzima *SacII* (10 U/ μ L), en un medio con 4,62 μ L de tampón C 10X (100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 500 mM NaCl, 10 mM DTT, pH 7,9) y 1,16 μ L de BSA acetilado (10 μ g/ μ L), a 37°C durante toda la noche. Finalmente, se purificó el producto de la reacción de acuerdo a lo descrito en la Sección 2.6.3.

2.7.2. Generación y purificación del “esqueleto” de pLZ01 a partir de pCLF3

Debido a que el plasmidio pCLF3 no contiene los sitios de restricción de las enzimas *XhoI* y *SacII*, se amplificó el plasmidio mediante PCR utilizando los partidores *XhoI_P2* y *SacII_CLF3_LZ*, los cuales agregan los sitios faltantes. Esta amplificación genera un producto lineal que conserva la estructura de pCLF3 y que en sus extremos posee sitios de restricción para *XhoI* y *SacII*. Para llevar a cabo la amplificación se utilizó la reacción y programa de PCR indicados a continuación:

Reacción de PCR (100 μ L)			Programa de PCR		
Componentes de la reacción	Volumen	Concentración	T°	Tiempo	Ciclos
DNA plasmidial: pCLF3	2 μ L	-	95°C	4 min	1 ciclo
Partidor directo [10 μ M]	3 μ L	0,3 μ M	98°C	20 s	30 ciclos
Partidor inverso [10 μ M]	3 μ L	0,3 μ M	60°C	15 s	
dNTPs [10 mM c/u]	3 μ L	0,3 mM	72°C	2 min	
Tampón 5X KAPA HiFi Fidelity	20 μ L	1X	72°C	5 min	1 ciclo
KAPA HiFi DNA pol. [1 U/ μ L]	2 μ L	0,5 U/reacción	4°C	∞	-
Agua	67 μ L	-			

Se obtuvo un producto de ~2,9 kb, el cual contiene en su extremo 5' el sitio de restricción de *XhoI* junto a la resistencia a Kan codificada en el gen *aph*. Por su parte, en su extremo 3' contiene el sitio de restricción de *SacII* junto al origen de replicación R6K (dependiente de la proteína Pi). Este producto fue purificado como se indica en la Sección 2.6.3.

Para realizar la ligación con el fragmento que contiene *gfpmut3*, los sitios de restricción agregados con los partidores de la reacción debieron ser digeridos con las enzimas *SacII* y *XhoI*. Para ello, 55 μ L del producto se incubaron con 1,59 μ L de la enzima *SacII* (10 U/ μ L), 6,36 μ L de tampón C 10X (100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 500 mM NaCl, 10 mM DTT, pH 7,9) y 0,64 μ L de BSA acetilado (10 μ g/ μ L), a 37°C durante toda la noche. El DNA digerido fue purificado de acuerdo a lo descrito en la Sección 2.6.3. Posteriormente, 30 μ L de este producto fueron incubados con 1,76 μ L de la enzima *XhoI* (10 U/ μ L) y 3,53 μ L de tampón R 10X (100 mM Tris HCl, 100 mM MgCl₂, 1 M KCl, 1 mg/ml BSA, pH 8,5), a 37°C durante toda la noche. El DNA digerido se purificó de acuerdo a lo descrito en la Sección 2.6.3. Para eliminar los remanentes de pCLF3 original, los 60 μ L del producto se incubaron con la enzima *DpnI* (10 U/ μ L) y 7,06 μ L de tampón Tango 10X (330 mM Tris-acetato, 100 mM Acetato de Magnesio,

660 mM Acetato de Potasio, 1 mg/mL BSA, pH 7,9), a 37°C toda la noche. Finalmente, el producto se purificó como se indica en la Sección 2.6.3, obteniéndose el “esqueleto” de pLZ01 libre del templado pCLF3.

2.7.3. Reacción de ligación

Los extremos cohesivos de los productos correspondientes al ORF del reportero GFP y el esqueleto de pLZ01 se ligaron con la enzima DNA ligasa del fago T4 (New England Biolabs), a 4°C durante toda la noche. Esta reacción contuvo 13 µL del fragmento que codifica a *gfpmut3*, 4 µL del esqueleto de pLZ01, 2 µL de tampón 10X para DNA ligasa (500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM ATP, 100 mM DTT, pH 7.5) y 1 µL de T4 DNA ligasa (New England Biolabs).

Finalmente, se dializaron 10 µL de la reacción filtros de nitrocelulosa de 0,025 µm (Millipore) y se transformó la cepa DH5α λ *pir* de acuerdo a lo descrito en la Sección 2.6.5, y se seleccionó en placas AL suplementadas con Cm y Amp. La selección de los clones que contenían la construcción esperada se realizó mediante PCR de colonia (Sección 2.6.6), utilizando los partidores *vgrG_GFP_td* y C3, los cuales se aparean con el inicio del ORF de *gfpmut3* y con el *cassette* de resistencia a cloranfenicol adyacente a éste.

2.8. Construcción de fusiones traduccionales y transcripcionales a *gfp* en *S. Typhimurium* para la observación por microscopía de epifluorescencia

Se construyeron fusiones traduccionales del ORF de *gfp* a los genes *STM14_0338* (ortólogo de *vgrG*, componente estructural del T6SS) y *ssaG* (componente estructural del T3SS codificado en SPI-2). Además, se construyeron fusiones transcripcionales del ORF de *gfp* a *STM14_0338*, *STM14_0324* y *STM14_0327* (los 2 últimos son ortólogos de *hcp*, componente estructural del T6SS). La mutagénesis se realizó mediante el método descrito por Gerlach *et al.* (2007), como se detalla a continuación.

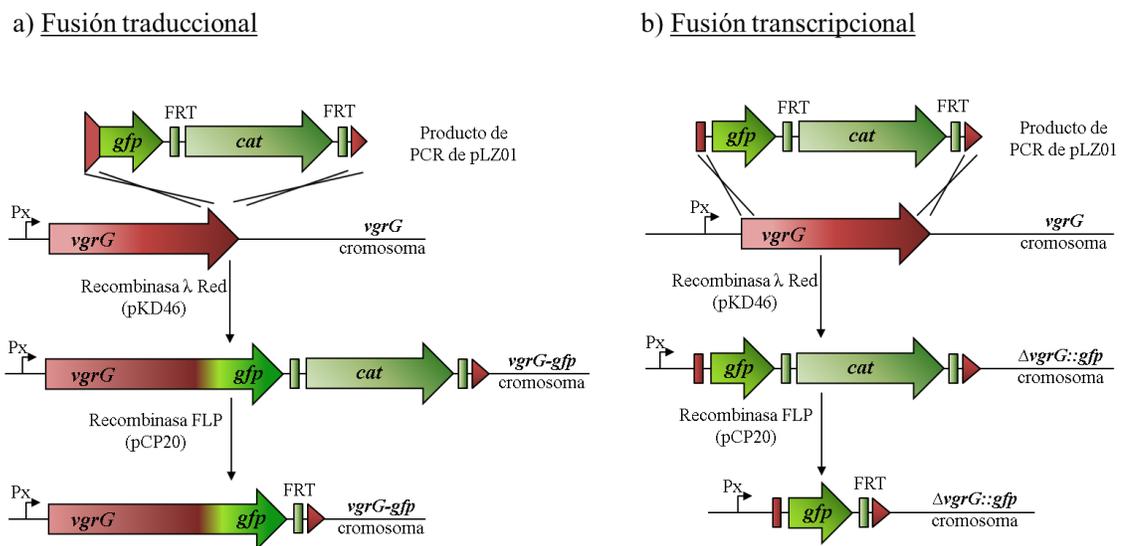


Figura 5. Representación esquemática de la construcción de fusiones a *gfp*. Fusiones (a) traduccionales y (b) transcripcionales al marco de lectura del reportero *gfp* a través de recombinación homóloga con productos de PCR, basada en lo descrito por Gerlach *et al.* (2007).

2.8.1. Obtención de productos de PCR para la generación de fusiones traduccionales y fusiones transcripcionales

Para generar fusiones traduccionales, se diseñaron partidores directos que poseen una región 5' de 40 nt que se aparee con los 40 nt que se encuentran río arriba del codón de término del ORF a mutar, y una región 3' de 21 nt que se aparee con los primeros 21 nt del marco de lectura de *gfpmut3* codificada en el plasmidio pLZ01. Para generar fusiones transcripcionales, se diseñaron partidores directos que poseen una región 5' de 40 nt que se aparee con 28 nt río arriba del codón de inicio y los primeros 12 nt del gen a mutar. Río abajo poseen un codón de término y una secuencia Shine-Dalgarno para asegurar la traducción del reportero. Las regiones 3' cuentan con 21 nt que se aparean con los primeros 21 nt del marco de lectura de *gfpmut3* codificada en el plasmidio pLZ01. Los partidores inversos, que fueron diseñados para ser utilizados tanto para fusiones traduccionales como transcripcionales, poseen una región 5' de 40 nt que se aparee con los 40 nt río abajo del codón de término del gen a mutar y una región 3' que se aparee con el sitio P1 del plasmidio pLZ01. Para llevar a cabo la amplificación se utilizó la reacción y programa de PCR indicado a continuación:

Reacción de PCR (100 μ L)			Programa de PCR		
Componentes de la reacción	Volumen	Concentración	T°	Tiempo	Ciclos
DNA plasmidial: pLZ01	2 μ L	-	95°C	4 min	1 ciclo
Partidor directo [10 μ M]	3 μ L	0,3 μ M	98°C	20 s	25 ciclos
Partidor inverso [10 μ M]	3 μ L	0,3 μ M	65°C	15 s	
dNTPs [10 mM c/u]	3 μ L	0,3 mM	72°C	1 min	
Tampón 5X KAPA HiFi Fidelity	20 μ L	1X	72°C	5 min	1 ciclo
KAPA HiFi DNA pol. [1 U/ μ L]	2 μ L	0,5 U/reacción	4°C	∞	-
Agua	67 μ L	-			

Se obtuvieron productos de amplificación de 1,8 kb, correspondientes a los genes *cat* (cloranfenicol acetiltransferasa; resistencia a Cm) y *aph* (aminoglicósido fosfotransferasa; resistencia a Kan) flanqueados por zonas homólogas a las regiones a mutar. Estos productos fueron purificados como se indica en la Sección 2.6.3.

2.8.2. Incorporación de las fusiones al cromosoma por recombinación homóloga

Se transformó *S. Typhimurium* 14028s con el plasmidio termosensible pKD46 (Tabla 2) como se indica en la Sección 2.6.5. Esta cepa se creció a 30°C con agitación en 20 mL de CL suplementado con Amp. Una vez que el cultivo alcanzó una DO_{600} de 0,3 se suplementó con L-arabinosa (10 mM) y se continuó con el crecimiento en las mismas condiciones hasta una DO_{600} de 0,6. Luego, se prepararon células electrocompetentes y se transformaron con los productos de PCR como se indica en la Sección 2.6.5. Finalmente, se seleccionaron aquellas colonias resistentes a Kan.

En cada fusión generada se verificó el correcto evento de recombinación mediante PCR utilizando un partidor que aparee en una región externa al sitio de reemplazo y uno que aparee en una región interna del *cassette* de resistencia.

2.8.3. Transducción de fusiones

Se utilizó el bacteriófago P22 HT *int* para movilizar las fusiones y mutaciones generadas por el método de reemplazo alélico por recombinación homóloga a un *background* genético limpio mediante transducción generalizada (Maloy *et al.* 1996).

2.8.3.1. Preparación de los lisados de P22 de las cepas dadoras

Desde un preinóculo crecido durante toda la noche a 37°C en CL suplementado con los antibióticos respectivos para cada mutante, se extrajeron 400 µL de cultivo y se mezclaron con 4 mL de P22 Broth (CL suplementado con MgSO₄ x 7H₂O 0,2 mg/mL, ácido cítrico 2 mg/mL, K₂HPO₄ x 3H₂O 13,1 mg/mL, NaNH₄HPO₄ x 4H₂O 3,5 mg/mL, glucosa 2 mg/mL y 100 µL de un lisado concentrado del fago P22 HT *int*) y se incubó toda la noche con agitación a 37°C. Luego, se agregaron 200 µL de cloroformo, se agitó vigorosamente y se centrifugó durante 10 min a 3900 x g. De la fase superior se tomaron 1,2 mL y se transfirieron a un tubo de microcentrífuga con 100 µL de cloroformo, el que fue vigorosamente agitado y centrifugado durante 5 min a 13000 x g. De la fase superior se tomó 1 mL que fue transferido a un nuevo tubo de microcentrífuga, el cual fue provisto de gotas de cloroformo, vigorosamente agitado y guardado a 4°C.

2.8.3.2. Transducción

Se cultivó la cepa receptora *S. Typhimurium* 14028s a 37°C en 3 mL de CL durante toda la noche. A 200 µL de este cultivo se le agregaron 20 µL de lisado de P22 de la cepa dadora y se incubó por 15 min a temperatura ambiente para permitir la adsorción del fago. De igual manera, se realizó un control sin bacteriófago (200 µL de cultivo sin agregar lisado) y un control sin bacteria (20 µL de lisado sin agregar cultivo de la cepa receptora). Posteriormente, se le agregó 1 mL de CL a cada uno de los tubos y se incubó durante 1 h a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugó a 13000 x g durante 2 min, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió en 1 mL de CL y se sembraron 200 µL en placas suplementadas con los antibióticos respectivos.

2.8.3.3. Selección de transductantes

Para obtener una cepa que no contenga partículas del fago P22, las bacterias son aisladas en cuadrante en placas EBU (AL suplementado con K₂HPO₄ 2,5 mg/L, Azul de Evans 12,5 mg/L y Uranina 25 mg/mL) hasta obtener colonias en que no haya lisis producto de P22 (colonias blancas). Para verificar que las colonias no contengan lisógenos estables, se determinó la sensibilidad de las mutantes al bacteriófago lítico P22 H5 en un ensayo denominado

cross streaking. En este ensayo sólo aquellas cepas que contienen P22 HT *int* (lisogénicas) son resistentes a la infección de P22 H5. Para este ensayo, se trazó el diámetro de una placa AL usando 100 µL de un lisado del bacteriófago P22 H5 propagado en la cepa *S. Typhimurium* 14028s. Una vez seca la placa, se sembraron las mutantes a ensayar trazando una línea que cruza perpendicularmente la línea generada por P22 H5. Luego de incubar la placa durante toda la noche a 37°C, se seleccionan aquellas mutantes en que se interrumpe el crecimiento luego de cruzar por el lisado.

2.8.4. Eliminación del *cassette* de resistencia

Para eliminar los *cassettes* de resistencia a antibiótico presentes en las mutantes construidas por el método de reemplazo alelico, se transformaron las diferentes cepas con el plasmidio termosensible pCP20 (Tabla 2) y se seleccionaron a 30°C en placas de AL suplementado con Amp. Este plasmidio contiene el gen que codifica la recombinasa FLP, la cual reconoce los sitios FRT que flanquean el *cassette* de resistencia y cataliza el corte y ligación de los extremos generados, dejando como cicatriz en el gen interrumpido una copia del sitio FRT. Posteriormente, se eligieron al azar algunas de las colonias obtenidas y se sembraron en placas AL con Amp, e incubaron a 30°C durante toda la noche. Estas colonias fueron resembradas por duplicado en placas AL y AL suplementado con el antibiótico al cual ofrece resistencia el *cassette*, e incubadas a 42°C durante toda la noche. Aquellas mutantes que fueron sensibles al antibiótico suplementado al medio, fueron resembradas por duplicado en placas AL y AL suplementado con Amp, e incubadas a 42°C. Esta última etapa se repitió hasta que las mutantes fueron sensibles a la Amp.

2.8.5. Transformación con el plasmidio pmCherry

Para la observación de bacterias al microscopio de epifluorescencia, todas las cepas conteniendo las distintas fusiones se transformaron con el plasmidio pmCherry (Tabla 2) como se indica en la Sección 2.6.5 y se seleccionaron en AL suplementado con Amp, obteniendo las cepas MTM1302/pmCherry, MTM1305/pmCherry, MTM1308/pmCherry, MTM1311/pmCherry, MTM1314/pmCherry (Tabla 1). Este plasmidio codifica una proteína

fluorescente roja (mCherry) que se expresa de manera constitutiva en 14028s y permite la observación de bacterias en que no se produzcan las proteínas fusionadas a GFPmut3.

2.9. Obtención de mutantes en genes del T6SS codificado en SPI-6 de *Salmonella Typhimurium*

Se construyeron mutantes por delección del gen *STM14_0319* (ortólogo de *clpV*) y del *cluster* que contiene los componentes del T6SS codificado en SPI-6 (T6SS_{SPI-6}), conservando el resto de los elementos codificados río abajo en la isla. La mutagénesis se realizó mediante el método de reemplazo alélico con productos de PCR descrito por Datsenko & Wanner (2000), como se detalla a continuación.

2.9.1. Obtención del producto de PCR para la mutagénesis

Para mutar *STM14_0319* se diseñaron partidores de 60 nt, los cuales poseen una región 5' de 40 nt que se aparean con 10 nt río arriba y 30 nt río abajo del codón de inicio de *STM14_0319* y 30 nt río arriba y 10 nt río abajo del codón de término de *STM14_0319*, más regiones 3' de 20 nt que se aparean con los sitios P1 y P2 del plasmidio pCLF2. Para mutar T6SS_{SPI-6} se diseñaron partidores de 60 nt, los cuales poseen regiones 5' de 40 nt que se aparean con ~10 nt después del gen del tRNA de ácido aspártico *aspV* y ~600 nt antes del codón de inicio del primer gen del operón *saf*, más regiones 3' de 20 nt que se aparean con los sitios P1 y P2 del plasmidio pCLF4.

Para amplificar el *cassette* de resistencia de los plasmidios pCLF2 y pCLF4 se utilizó la siguiente reacción y programa de PCR:

Reacción de PCR (100 μ L)			Programa de PCR		
Componentes de la reacción	Volumen	Concentración	T°	Tiempo	Ciclos
DNA plasmidial	5 μ L		95°C	5 min	1 ciclo
Partidor 1 [10 μ M]	2 μ L	0,2 μ M	95°C 55°C 72°C	30 s	30 ciclos
Partidor 2 [10 μ M]	2 μ L	0,2 μ M		30 s	
dNTPs [10 mM c/u]	2 μ L	0,2 mM		2 min	
MgCl ₂ [25 mM]	6 μ L	1,5 mM	72°C	10 min	1 ciclo
Tampón 5X Go-Taq Flexi	20 μ L	1X			
Go-Taq polimerasa [5 U/ μ L]	0,5 μ L	2,5 U/reacción	4°C	∞	-
Agua	62,5 μ L				

Se obtuvieron productos de amplificación de 1,2 kb y 1,5 kb, correspondientes a los genes *cat* y *aph* flanqueados por zonas homólogas a las regiones a mutar. Estos productos fueron purificados como se indica en la Sección 2.6.3.

Los productos de PCR obtenidos se utilizaron para realizar la mutagénesis como se indica en la Sección 2.8.1. A partir de todas las mutantes obtenidas se prepararon lisados de P22 para movilizar las mutaciones a la cepa silvestre, como se indica en la Sección 2.8.2. Finalmente, las mutantes fueron transformadas con el plasmidio pCP20 para eliminar los *cassettes* de resistencia, de acuerdo a la Sección 2.8.3, obteniendo las cepas MTM1319 y MTM1317.

2.9.2. Complementación de mutantes

Para realizar la complementación en *trans* de la mutante MTM1319, se utilizó el vector pClpV, correspondiente al vector de expresión pWSK29 con una región de ~3 kb del genoma de *S. Typhimurium* 14028s clonada río abajo del promotor del operón *lac*. La región clonada comienza 260 pb río arriba de *STM14_0319* y termina 85 pb río abajo de éste. La mutante MTM1319 se transformó con los plasmidios pWSK29 y pClpV como se indica en la Sección 2.6.5 y se seleccionaron las transformantes MTM1319/pWSK29 y MTM1319/pClpV en placas AL suplementadas con Amp.

2.10. Construcción de cepas transformadas con derivados de pFlagTEM1

2.10.1. Clonamiento de *vgrG* en el vector pFlagTEM1

Se clonó el ORF de *STM14_0338* (ortólogo del componente estructural *vgrG*) en el vector pFlagTEM1, incorporando el epítipo 3xFlag y la β -lactamasa TEM-1 al extremo carboxilo terminal de VgrG, generando así el vector pVgrGFT.

2.10.1.1. Generación del inserto *vgrG*

Mediante PCR de alta fidelidad se amplificó a partir de DNA genómico de 14028s el ORF de *STM_0338*, utilizando el partidor directo *NdeI_Vgrg_SPI6_Dub_Tm14_Fwd* que se apareja con los primeros 20 nt del marco de lectura y el partidor *XhoI_Vgrg_SPI6_Tm14-rev* que se apareja con 18 nt río arriba del codón de término, de acuerdo a las condiciones presentadas a continuación:

Reacción de PCR (100 μ L)			Programa de PCR		
Componentes de la reacción	Volumen	Concentración	T°	Tiempo	Ciclos
DNA genómico 14028s	2 μ L	-	95°C	4 min	1 ciclo
Partidor directo [10 μ M]	3 μ L	0,3 μ M	98°C	20 s	25 ciclos
Partidor inverso [10 μ M]	3 μ L	0,3 μ M	65°C	15 s	
dNTPs [10 mM c/u]	3 μ L	0,3 mM	72°C	1 min	
Tampón 5X KAPA HiFi Fidelity	20 μ L	1X	72°C	5 min	1 ciclo
KAPA HiFi DNA pol. [1 U/ μ L]	2 μ L	0,5 U/reacción	4°C	∞	-
Agua	67 μ L	-			

Se obtuvo un producto de amplificación de 2,1 kb, el cual corresponde al ORF de *vgrG* flanqueado por un sitio de restricción de la enzima *NdeI* adicionado con el partidor directo *NdeI_Vgrg_SPI6_Dub_Tm14_Fwd* en el extremo 5' y un sitio de restricción de la enzima *XhoI* adicionado con el partidor inverso *XhoI_Vgrg_SPI6_Tm14-rev* en el extremo 3'. El producto generado se purificó de acuerdo a lo señalado en la Sección 2.6.3.

Para generar extremos cohesivos 62 μ L del producto de PCR purificado fueron digeridos con 1,77 μ L de la enzima de restricción *NdeI* (10 U/ μ L) y 7,09 μ L de tampón O 10X (500 mM

Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 1000 mM NaCl, 1 mg/mL BSA, pH 7,5), a 37°C durante toda la noche. Luego, el producto digerido se purificó de acuerdo a la Sección 2.6.3, obteniendo 70 µL del amplicón. 62 µL de este producto purificado fue nuevamente sometido a digestión, con 3,64 µL de la enzima de restricción *XhoI* y 7,29 µL de tampón R 10X (100 mM Tris HCl, 100 mM MgCl₂, 1000 mM KCl, 1 mg/ml BSA, pH 8,5), a 37°C durante toda la noche. Finalmente, se purificó el producto de la digestión de acuerdo a lo descrito en la Sección 2.6.3, obteniendo un inserto con extremos cohesivos para la posterior ligación.

2.10.1.2. Digestión y linealización de pFlagTEM1

A partir de la cepa DH5α/pFlagTEM1 se extrajo DNA plasmidial de acuerdo a los descrito en la Sección 2.6.2. Para generar la inserción de *vgrG* en el vector pFlagTEM1, se realizaron digestiones en los sitios de restricción de las endonucleasas *NdeI* y *XhoI*, los cuales se encuentran entre el promotor *trc* y el epítipo 3xFlag. Para esto, 62 µL de pFlagTEM1 fueron digeridos con 1,77 µL de la enzima *NdeI* (10 U/µL), en un medio con 7,09 µL de tampón O 10X (500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 1000 mM NaCl, 1 mg/mL BSA, pH 7,5), a 37°C durante toda la noche. El producto de la digestión se purificó de acuerdo a lo descrito en la Sección 2.6.3, obteniendo 65 µL del vector linealizado. Posteriormente, 62 µL del vector purificado se sometieron a una segunda digestión, utilizando 3,64 µL de la enzima de restricción *XhoI* y 7,29 µL de tampón R 10X (100 mM Tris HCl, 100 mM MgCl₂, 1000 mM KCl, 1 mg/ml BSA, pH 8,5), a 37°C durante toda la noche. Este producto se purificó de acuerdo a lo descrito en la Sección 2.6.3, obteniendo un vector linealizado con extremos cohesivos para la posterior ligación.

2.10.1.3. Reacción de ligación

Los extremos cohesivos de los productos correspondientes al ORF de *vgrG* y el vector pFlagTEM1 linealizado fueron ligados con la enzima DNA ligasa del fago T4 (New England Biolabs), a 4°C durante toda la noche. Esta reacción contenía 12 µL del fragmento que codifica a *vgrG*, 5 µL de pFlagTEM1 linealizado, 2 µL de tampón 10X para DNA ligasa (500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM ATP, 100 mM DTT, pH 7.5) y 1 µL de DNA ligasa del fago T4.

Finalmente, se dializaron 10 μ L de la reacción en filtros de nitrocelulosa de 0,025 μ m (Millipore), se transformó la cepa DH5 α de acuerdo a lo descrito en la Sección 2.6.3 y se seleccionó en placas AL suplementadas con Cm. La selección de los clones que contenían la construcción esperada se realizó mediante PCR de colonias (Sección 2.6.6), utilizando la pareja de partidores flagtem_MCS_out5, flagtem_MCS_out3 y la pareja VgrG_SPI6_out5_check, flagtem_MCS_out3.

2.10.2. Evaluación de la producción *in vitro* de la proteína recombinante VgrGFT

Con objeto de verificar la correcta expresión de las construcciones se evaluó la producción *in vitro* de la proteína VgrGFT (VgrG fusionada por su extremo carboxilo terminal al epítipo 3xFlag y a la β -Lactamasa TEM-1) en las cepas DH5 α /pVgrGFT verificadas mediante PCR. Posteriormente, se extrajo el vector pVgrGFT (Sección 2.6.2) de aquellos clones en que se expresó correctamente y se utilizó para transformar la cepa 14028s. Finalmente, se evaluó la producción *in vitro* de la proteína VgrGFT en distintos clones de 14028s/pVgrGFT.

2.10.2.1. Obtención de proteínas a partir de DH5 α /pVgrGFT y 14028S/pVgrGFT

Se sembraron en duplicado las cepas DH5 α , DH5 α /pFlagTEM1 y DH5 α /pVgrGFT en 20 mL de caldo LB suplementado con Cm y se incubaron a 37°C con agitación. Una vez que los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ ~0,2 se suplementaron con IPTG 0,5 mM (para inducir la expresión de VgrGFT) o glucosa 1% (para reprimir la expresión de VgrGFT) y se incubó a 37°C con agitación hasta que alcanzaron una DO₆₀₀ ~0,6. Las bacterias se sedimentaron a 3900 x g durante 10 min, se resuspendieron en NaCl 150 mM y se sedimentaron a 3900 x g durante 10 min. Las muestras se normalizaron a 100 mg de biomasa húmeda/mL y se mezclaron con el volumen adecuado de tampón de carga 5X (35% glicerol, 106,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% SDS, 25% 2-mercaptoetanol, 0,005% azul de bromofenol). Las muestras se calentaron a 100°C durante 5 min y luego se congelaron a -20°C hasta su uso.

2.10.2.2. SDS-PAGE

Se prepararon geles de poli(acrilamida) de 1 mm de ancho en una cámara mini-Protean III (Bio-Rad) de acuerdo a lo indicado en la siguiente tabla:

Gel resolutivo 10%	
Componentes de la reacción	Volumen
1.5M Tris-HCl pH 8.3 + 0.4% SDS	1219 μ L
30% Acrilamida 0.8% Bis-acrilamida	1619 μ L
H ₂ O	2141 μ L
10% Persulfato de Amonio	17,4 μ L
TEMED	4 μ L

Luego de cargar la mezcla del gel resolutivo, se cubrió la solución con isopropanol y se incubó a temperatura ambiente. Una vez concluída la polimerización del gel resolutivo, se retiró el isopropanol y se cargó la mezcla del gel concentrador presentada en la siguiente tabla:

Gel concentrador 4%	
Componentes de la reacción	Volumen
0.5M Tris-HCl pH 6.8+ 0.4% SDS	500 μ L
30% Acrilamida 0.8% Bis-acrilamida	200 μ L
H ₂ O	1280 μ L
10% Persulfato de Amonio	20 μ L
TEMED	2 μ L

Los geles se pre-corrieron con tampón de corrida (25mM Tris-HCl, 200mM Glicina, 0,1% SDS) a 80 V durante 20 min. Posteriormente, se cargaron 3 μ L de estándar de peso molecular PageRuler™ (Fermentas) y 3 μ L de cada una de las muestras a analizar y se realizó la electroforesis a 35 V mientras las muestras permanecían en el gel concentrador y a 50 V cuando éstas entraron en el gel resolutivo.

2.10.2.3. Electrotransferencia e inmunoblot

Se realizó la transferencia de proteínas por vía húmeda a una membrana de PVDF en una cámara mini Trans-Blot de Bio-Rad llena con tampón de transferencia (192 mM glicina, 25 mM tris base, 0,01% SDS, 20% metanol), a 230 mA constantes durante 70 min. Luego, las

membranas fueron bloqueadas con una solución de leche descremada al 5% preparada en TBS (137 mM NaCl, 20 mM Tris base, pH 7.6.), a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, se eliminó el exceso de solución bloqueadora con un lavado con TBS y se realizó una incubación con el anticuerpo primario ANTI-FLAG[®] M2 (Stratagene) diluido 1:10.000 en una solución de TBS 5% BSA, a 4°C durante toda la noche. Luego, se realizaron 3 lavados de 15 min cada uno con TBS y se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón (Thermo) conjugado a peroxidasa de rábano, diluido 1:125.000 durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron 3 lavados de 15 min cada uno con TBS y se reveló utilizando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West-Pico, con exposición en película CL-XPosure.

2.10.2.4. Tinción de gel de poliacrilamida con azul de Coomassie

Una vez finalizada la electroforesis (Sección 2.10.2.2.), el gel se incubó con solución de tinción (0,25% Azul brillante Coomassie R-250, 50% metanol, 10% ácido acético) durante toda la noche a temperatura ambiente con agitación constante. Para desteñir, el gel se sumergió en solución de desteñido (15% metanol, 10% ácido acético) y se mantuvo con agitación constante y renovación frecuente de la solución hasta observar bandas definidas y fondo transparente. Finalmente, el gel fue rehidratado con sucesivos lavados en agua destilada.

2.10.3. Transformación de cepas con pFlagTEM1, pSipAFT y pVgrGFT

La cepa 14028s, una mutante de SPI-1 (MTM1315) y mutantes de *clpV* (MTM1319/pWSK29 y MTM1319/pClpV) se transformaron con el plasmidio pFlagTEM1 y los derivados pSipAFT y pVgrGFT para la generación de las cepas 14028s/FlagTEM1, 14028s/pSipAFT, MTM1315/pSipAFT, 14028s/pVgrGFT, MTM1319/pWSK29/pVgrGFT y MTM1319/pClpV/pVgrGFT. La mutante Δ SPI-1 se construyó mediante transducción generalizada utilizando un lisado de P22 preparado de una mutante *S. Typhimurium* SL1344 Δ SPI-1::*aph* (delección desde el gen *avrA*, STM2865, a *invF*, STM2899) de acuerdo a lo indicado en la Sección 2.8.3.2, mientras que las cepas MTM1319/pWSK29 y MTM1319/pClpV se construyeron por el método de reemplazo alélico por recombinación homóloga (Sección 2.9.2). Las transformantes fueron seleccionadas en AL suplementado con los antibióticos respectivos para cada cepa (Tabla1).

2.11. Condiciones de cultivo celular

2.11.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo

Se utilizaron dos líneas celulares de macrófagos: RAW264.7 (ATCC TIB-71), derivadas de macrófagos de ratones BALB/c, y HD11, derivadas de células hematopoyéticas aviares (Beug et al., 1979). Ambas se cultivaron en botellas de 75 cm² con 10 mL de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con alta concentración de glucosa (584 mg/L L-glutamina, 4500 mg/L glucosa, 110 mg/L piruvato de sodio) suplementado con 8% de suero fetal bovino (FBS) inactivado y solución antibiótica/antimicótica 100X (10000 U/mL penicilina G, 10000 µg/mL estreptomicina, 25 µg/mL anfotericina B), a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂.

2.11.2. Preparación de monocapas de células RAW264.7y HD11

En todos los casos, las monocapas utilizadas para los ensayos de infección se prepararon 20 h antes de cada experimento para obtener una confluencia de ~70%. Para ello, el medio de cultivo se sustituyó por 7 mL de DMEM suplementado con 8% de FBS (DMEM-FBS) y los macrófagos se soltaron mecánicamente con un raspador de células. Para determinar la concentración de células viables, la suspensión celular se contó en una cámara de Neubauer mezclada en razón 1:1 con una solución 0,4% de azul de Tripán.

Para los ensayos de producción de componentes del T6SS en el interior de macrófagos (Sección 2.12), se sembraron $3,75 \cdot 10^5$ macrófagos (RAW264.7 o HD11) por pocillo en 1mL de DMEM-FBS, en placas de 6 pocillos (9,6 cm² cada pocillo) que contenían cubreobjetos estériles en su interior. La placa se incubó a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ hasta el inicio del ensayo. Antes del ensayo, se realizó un recuento inicial de células vivas, para lo cual 1 pocillo de la placa se trató con 200 µL de 0,25% tripsina-EDTA, se incubó 5 min a 37°C, se agregaron 200 µL de DMEM-FBS y se realizó el recuento con azul de Tripán en una cámara de Neubauer.

Para los ensayos de translocación de componentes del T6SS al citoplasma de macrófagos (Sección 2.13), se sembraron 10^5 macrófagos (RAW264.7 o HD11) por pocillo en 200 µL de DMEM-FBS, en placas de 96 pocillos con fondo óptico. La placa se incubó a 37°C en

una atmósfera con 5% de CO₂ hasta el inicio del ensayo. Previamente se realizó un recuento inicial de células vivas, para lo cual 3 pocillos de la placa se trataron con 50 µL de 0,25% tripsina-EDTA, se incubó 5 min a 37°C, se agregaron 50 µL de DMEM-FBS y se realizó el recuento con azul de Tripán en una cámara de Neubauer.

Para los ensayos de invasión y supervivencia (Sección 2.14), se sembraron $2 \cdot 10^5$ macrófagos (RAW264.7 o HD11) por pocillo en 200 µL de DMEM-FBS, en placas de 48 pocillos. La placa se incubó a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ hasta el inicio del ensayo. Previamente se realizó un recuento inicial de células vivas, para lo cual 3 pocillos de la placa se trataron con 70 µL de 0,25% tripsina-EDTA, se incubó 5 min a 37°C, se agregaron 70 µL de DMEM-FBS y se realizó el recuento con azul de Tripán en una cámara de Neubauer.

2.12. Ensayo de producción de componentes del T6SS en el interior de macrófagos

Para realizar este ensayo (Figura 6), se utilizaron las cepas MTM1302/pmCherry, MTM1305/pmCherry, MTM1308/pmCherry, MTM1311/pmCherry y MTM1314/pmCherry (Sección 2.8.5). Los cultivos bacterianos se incubaron como se indica en la Sección 2.5, suplementando el medio con Amp, hasta una DO₆₀₀ de 0,3 (~3 h de incubación). Con la DO₆₀₀ de los cultivos y una curva empírica obtenida en el laboratorio, se obtuvo un valor referencial de UFC/mL y se tomó una alícuota considerando una multiplicidad de infección (M.O.I.) de aproximadamente 100 UFC/macrófago. Las bacterias se lavaron 3 veces con PBS (sedimentación a 13000 x g durante 2 min y resuspensión en PBS) y luego se resuspendieron en DMEM-FBS. Finalmente, se agregaron 50 µL de la suspensión bacteriana sobre las monocapas de células RAW264.7 o HD11 (Sección 2.11.2) previamente lavadas 3 veces con PBS. Se conservó una alícuota de cada inóculo para realizar un recuento de las UFC totales agregadas.

Las placas se centrifugaron durante 10 min a 6 x g para sincronizar la invasión. Luego se incubaron a 37°C durante 45 min para permitir la invasión bacteriana. Posteriormente, las bacterias extracelulares adheridas a la monocapa se eliminaron mediante 3 lavados con PBS suplementado con 200 µg/mL de gentamicina. En este punto, los cubreobjetos correspondientes a 0 h post-infección se fijaron con una solución 4% folmaldehído preparado en PBS, durante 20 min a temperatura ambiente. Los cubreobjetos correspondientes a 1, 6, 12 y 24 h post-infección

se incubaron a 37°C durante 1 h en DMEM-FBS suplementado con 200 µg/mL de gentamicina y luego se lavaron 3 veces con PBS suplementado con 10 µg/mL de gentamicina. Los cubreobjetos correspondientes a 1 h post-infección se fijaron con formaldehído y los restantes se incubaron en DMEM-FBS suplementado con 10 µg/mL de gentamicina hasta cumplir las 6, 12 y 24 h post-infección. Una vez concluida la incubación con DMEM-FBS suplementado con 10 µg/mL de gentamicina, los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con formaldehído. Finalmente, todos los cubreobjetos fueron adheridos a portaobjetos con medio de montaje con DAPI (ProLong® Gold antifade reagent with DAPI, Invitrogen) luego de la fijación.

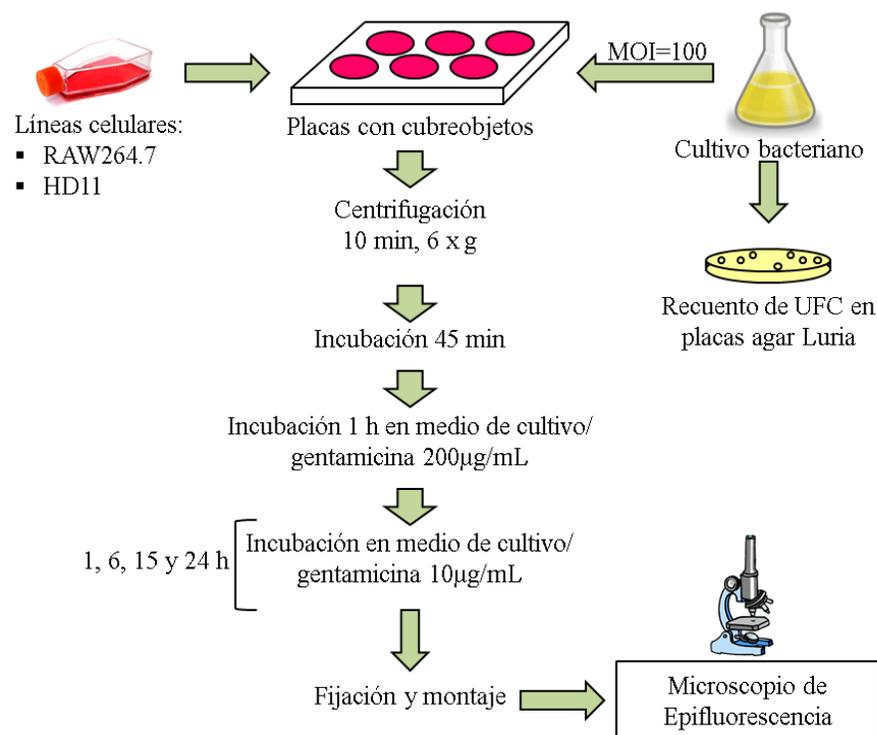


Figura 6. Protocolo experimental para los ensayos de transcripción y síntesis de componentes del T6SS_{SPL-6} de *S. Typhimurium* en macrófagos RAW264.7 y HD11.

Las muestras se analizaron en un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX 81) utilizando filtros para DAPI (341 ± 30 nm excitación/ 452 ± 30 nm emisión) para observar los núcleos de los macrófagos, RFP (582 ± 20 nm excitación/ 625 ± 30 nm emisión) para observar la producción de la proteína mCherry, y GFP (485 ± 24 nm excitación/ 537 ± 40 nm emisión) para

observar la producción de proteínas fusionadas a GFPmut3. La captura de imágenes se realizó con una cámara AxioCam MRC5 (Zeiss) y el software CellR (Olympus).

2.13. Ensayo de translocación de componentes del T6SS al citoplasma de macrófagos

Para realizar este ensayo (Figura 7) se utilizaron las cepas 14028S/pFlagTEM1, MTM1319/pWSK29/pVgrGFT, MTM1319/pClpV/pVgrGFT, 14028S/pSipAFT y MTM1315/pSipAFT (Sección 2.10.3). Los cultivos bacterianos se incubaron como se indica en la Sección 2.5 durante 2 h, suplementando el medio con los antibióticos correspondientes para cada cepa (Tabla 1). Luego, se suplementó con 1mM IPTG e incubó durante 1 h en las mismas condiciones. Con la DO_{600} de los cultivos y una curva empírica obtenida en el laboratorio, se obtuvo un valor referencial de UFC/mL y se tomó una alícuota considerando una M.O.I. de aproximadamente 100 UFC/macrófago. Las bacterias se lavaron 3 veces con PBS (sedimentación a 13000 x g durante 2 min y resuspensión en PBS) y luego se resuspendieron en DMEM-FBS suplementado con 1 mM IPTG. Finalmente, se agregaron 50 μ L de la suspensión bacteriana sobre las monocapas de células RAW264.7 o HD11 (Sección 2.11.2) previamente lavadas 3 veces con PBS. Se conservó una alícuota de cada inóculo para realizar un recuento de las UFC totales agregadas.

Las placas se centrifugaron durante 10 min a 6 x g para sincronizar la invasión. Luego se incubaron a 37°C durante 45 min para permitir la invasión bacteriana. Posteriormente, las bacterias extracelulares adheridas a la monocapa se eliminaron mediante 3 lavados con PBS suplementado con 200 μ g/mL de gentamicina y se incubaron con DMEM-FBS suplementado con 200 μ g/mL de gentamicina y 1 mM IPTG a 37°C durante 1 h. Una vez terminada esta incubación, las células se lavaron 3 veces con PBS suplementado con 10 μ g/mL de gentamicina y se incubaron con DMEM-FBS suplementado con 10 μ g/mL de gentamicina y 1 mM IPTG a 37°C. Para el análisis por microscopía, 2 pocillos por cepa se incubaron durante 1 h (t_1) y 2 pocillos por cepa se incubaron durante 15 h (t_{15}). Para el análisis por fluorometría, un grupo de 4 pocillos por cepa se incubó durante 20 h (t_{20}). Luego de este período, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubó con el sustrato fluorogénico CCF2-AM (LiveBLAzer™ FRET, Invitrogen) durante 2 h a temperatura ambiente en oscuridad.

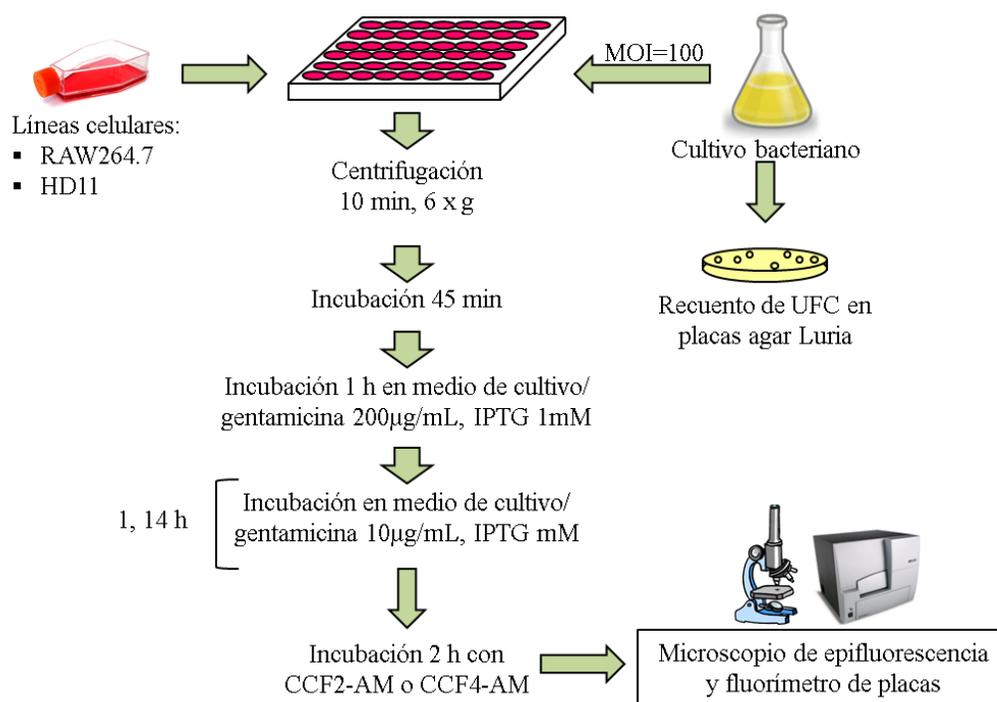


Figura 7. Protocolo experimental para los ensayos de translocación de proteínas bacterianas fusionadas a flagTEM1 macrófagos RAW264.7 y HD11.

Las muestras se analizaron en un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX 81), excitando las muestras a 341 ± 30 nm y observado la emisión con filtros de 537 ± 40 nm (verde) para ver el sustrato CCF2 íntegro, y 452 ± 30 nm (azul) para ver el sustrato CCF2 hidrolizado. La captura de imágenes se realizó con una cámara Axiocam MRC5 (Zeiss) y el software CellR (Olympus).

Para cuantificar la translocación de las proteínas fusionadas a la β -lactamasa TEM1 se utilizó un fluorímetro de placas (Synergy H1, BioTek, USA), excitando cada pocillo a 410 ± 10 nm y escaneando la fluorescencia a 450 nm y 520 nm para cada pocillo. Con la fluorescencia a ambas longitudes de onda se calculó un índice de translocación (IT), correspondiente a una relación entre la fluorescencia a 447 nm y 520 nm de la monocapas de macrófagos infectados, normalizada por el valor de la cepa 14028s/pFlagTEM1.

$$IT = \frac{\text{Razón} \frac{447nm}{520nm} \text{ macrófagos inf. cepa X}}{\text{Razón} \frac{447nm}{520nm} \text{ de macrófagos inf. 14028s/pFlagTEM1}}$$

2.14. Ensayo de invasión y supervivencia en macrófagos

Para realizar este ensayo (Figura 8) se utilizaron las cepas 14028S, MTM1317, MTM1321, 14028S/pWSK29, MTM1319/pWSK29, MTM1319/pClpV y MTM1321/pWSK29 (Sección 2.9). Los cultivos bacterianos se incubaron como se indica en la sección 2.5 hasta una DO_{600} de 0,3 (aproximadamente 3 h de incubación). Con la DO_{600} de los cultivos y una curva empírica obtenida en el laboratorio, se obtuvo un valor referencial de UFC/mL y se tomó una alícuota considerando una M.O.I. de ~ 50 UFC/macrófago. Las bacterias se lavaron 3 veces con PBS (sedimentación a $13000 \times g$ durante 2 min y resuspensión en PBS) y luego se resuspendieron en DMEM-FBS. Finalmente, se agregaron 50 μ L de la suspensión bacteriana sobre las monocapas de células RAW264.7 o HD11 (Sección 2.11.2) previamente lavadas 3 veces con PBS. Se conservó una alícuota de cada inóculo para realizar un recuento de las UFC totales agregadas.

Las placas se centrifugaron durante 10 min a $6 \times g$ para sincronizar la invasión. Luego se incubaron a $37^{\circ}C$ durante 45 min para permitir la invasión bacteriana. Posteriormente, las bacterias extracelulares adheridas a la monocapa se eliminaron mediante 3 lavados con PBS suplementado con 200 μ g/mL de gentamicina y se incubaron con DMEM-FBS suplementado con 200 μ g/mL de gentamicina a $37^{\circ}C$ durante 1 h. Una vez terminada esta incubación, las células se lavaron 3 veces con PBS. Este punto fue considerado como tiempo 0 de la infección (t_0). Luego de lavar con PBS, un grupo de pocillos se incubó durante 20 h con DMEM-FBS suplementado con gentamicina 10 μ g/mL. Una vez terminada esta incubación, las células se lavaron 3 veces con PBS y se estableció este punto como tiempo 20 (t_{20}). En los tiempos 0 y 20, se trataron 2 pocillos por cepa con 70 μ L de 0,25% tripsina-EDTA, se incubó 5 min a $37^{\circ}C$, se agregaron 70 μ L de DMEM-FBS y se realizó el recuento con azul de Tripán en una cámara de Neubauer. Además, en los tiempos 0 y 20, se trataron grupos de 4 o 5 pocillos por cepa con 100 μ L de desoxicolato de sodio 0,5% preparado en PBS y se incubó 5 min a $37^{\circ}C$. Sobre este

volumen se agregó 900 μL de PBS para llevar a una dilución de 10^{-1} y realizar a partir de ésta las diluciones adecuadas para sembrar alícuotas sobre AL y determinar las UFC intracelulares.

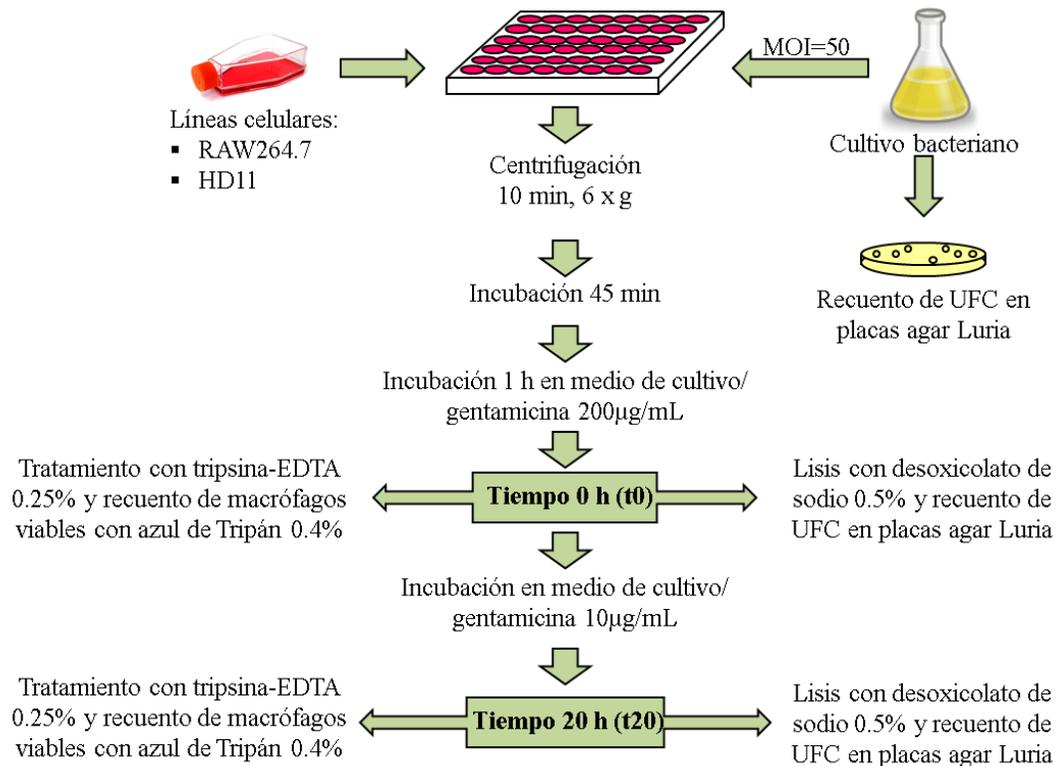


Figura 8. Protocolo experimental para los ensayos de internalización y supervivencia bacteriana en las líneas celulares RAW264.7 y HD11.

La invasión se calculó como porcentaje de bacterias intracelulares respecto al inóculo inicial. Por otra parte, la supervivencia se calculó como bacterias intracelulares respecto al número de macrófagos viables al tiempo 20.

$$\% \text{ invasión} = \frac{\text{UFC recuperadas en } t_0}{\text{UFC inoculadas}} \cdot 100$$

$$\text{UFC/macrófagos} = \frac{\text{UFC recuperadas en } t_{20}}{\text{macrófagos en } t_{20}}$$

2.15. Análisis estadístico

Los ensayos de translocación de proteínas bacterianas al citosol de los macrófagos se realizaron en cuatuplicado por cada cepa estudiada. Los índices de translocación obtenidos fueron analizados utilizando el test estadístico *t* de Student de dos colas, comparando los valores de cada cepa con los valores obtenidos por el control negativo 14028s/pFlagTEM1.

Los ensayos de internalización y supervivencia intracelular se realizaron al menos tres veces en cuatuplicado por cada cepa estudiada. Los porcentajes de internalización y UFC/macrófagos de cada ensayo fueron promediados, para posteriormente analizar los promedios obtenidos para cada cepa. Utilizando el test estadístico *t* de Student de dos colas, se compararon los valores de cada cepa con los valores obtenidos por la cepa parental. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el *software* GraphPad Prism 5.0.

3. RESULTADOS

3.1. Construcción del vector pLZ01 para la generación de fusiones cromosomales a *gfpmut3*

La generación de fusiones transcripcionales y traduccionales es una herramienta que permite obtener, de manera rápida y confiable, perfiles de expresión en distintas condiciones de estudio. Anteriormente, el grupo de Gerlach *et al.* (2007) desarrolló un método para la generación de fusiones cromosomales a distintos genes reporteros basándose en el método de recombinación homóloga con productos de PCR, donde los genes reporteros son amplificados desde un set de plasmidios. Sin embargo, estos plasmidios presentan dos grandes falencias que interfieren con la rápida y eficiente obtención de recombinantes positivas: i) origen de replicación ColE1, por lo cual los plasmidios pueden replicarse eficientemente al ingresar a *Salmonella*. Como consecuencia de esto, trazas del plasmidio utilizado como templado para generar los productos de PCR pueden replicarse, generando un gran número de falsos positivos al poseer los mismos marcadores de resistencia a antibiótico que el producto de PCR. ii) El *cassette* de resistencia a antibiótico que posee el plasmidio se encuentra en dirección opuesta al sentido de la transcripción de la fusión. Esto es causante de problemas en la expresión del gen de resistencia a antibiótico, lo cual disminuye la probabilidad de seleccionar recombinantes positivas. Para resolver este problema, en este trabajo se construyó el plasmidio pLZ01 (Figura 9), el cual contiene un origen de replicación que no es funcional en un gran número de serovares de *Salmonella* (origen R6K). Además, en su diseño se consideró una orientación del *cassette* de resistencia a antibiótico en el mismo sentido de transcripción que la fusión cromosomal.

Para la construcción de pLZ01 (Figura 4) se clonó el ORF del gen reportero *gfpmut3* en el plasmidio pCLF3, que ha mostrado una alta eficiencia en la generación de mutantes en *Salmonella* (Santiviago *et al.*, 2009). Para esto, se amplificó el ORF de *gfpmut3* del plasmidio p3174 (Gerlach *et al.*, 2007) con los partidores M13F y M13R. Posteriormente, el producto se sometió a digestión con las enzimas de restricción *SacII* y *XhoI*. Debido a la ausencia de los sitios de restricción para las enzimas *SacII* y *XhoI* en pCLF3, necesarios para el clonamiento, se incorporaron en los partidores *SacII*_CLF3_LZ y *XhoI*_P2 utilizados en la amplificación de

pCLF3. Las distintas etapas fueron confirmadas analizando los productos mediante PCR (Figura 10). Luego de la reacción de ligación y posterior transformación de la cepa DH5 α λ *pir* con el plasmidio recombinante pLZ01, se analizaron 5 clones mediante PCR, obteniendo dos clones positivos (Figura 11).

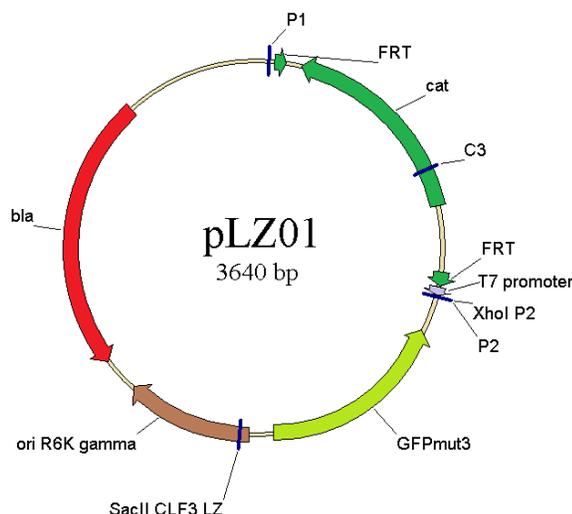


Figura 9. Representación esquemática del plasmidio pLZ01. Plasmidio con origen de replicación R6K gamma, *cassette* de resistencia a ampicilina, *cassette* de resistencia a cloranfenicol flanqueado por sitios P1 y P2, promotor T7 y marco de lectura del gen *gfpmut3*.

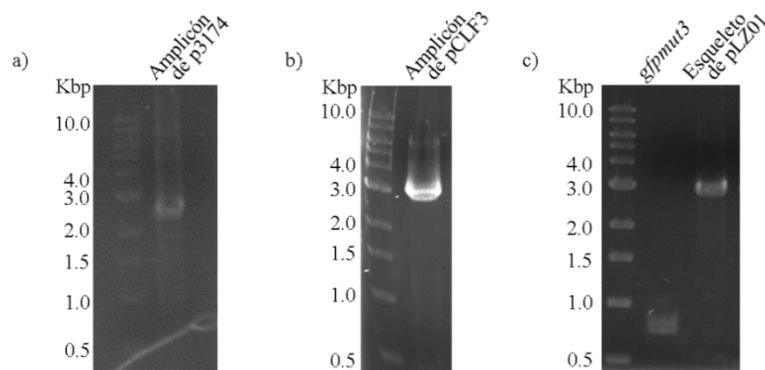


Figura 10. Obtención y análisis de los fragmentos de DNA obtenidos para construir el plasmidio pLZ01. Electroforesis en gels 1% agarosa teñidos con bromuro de etidio de: **(a)** Amplicón que codifica *gfpmut3*, generado a partir del plasmidio p3174 con los partidores M13F y M13R. Tamaño esperado del producto: ~2,4 kb. **(b)** Amplicón generado a partir de pCLF3 con los partidores XhoI_P2 y SacII_CLF3_LZ. Tamaño esperado del producto: ~2,9 kb. **(c)** Fragmentos de DNA digeridos con las

enzimas *Xho*I y *Sac*II, correspondientes al marco de lectura de *gfpmut3* y al esqueleto de pLZ01. Tamaño esperado de los fragmentos: ~860 pb (*gfpmut3*) y ~2,9 kb (esqueleto pLZ01).

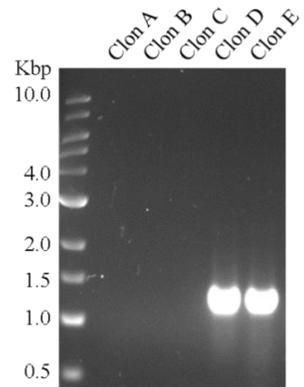


Figura 11. Confirmación de la construcción del plasmidio pLZ01 mediante PCR. Electroforesis en gel 1% agarosa del amplicón generado mediante PCR de colonias DH5α λ *pir* transformadas con el producto de ligación pLZ01, utilizando los partidores *vgrG_GFPtd_14028fw* (partidor que se aparea con *gfpmut3*) y C3 (partidor que se aparea con una región de pCLF3). Tamaño del producto esperado: ~1170 pb.

3.2. Análisis de la producción de Hcp1, Hcp2 y VgrG durante la infección de macrófagos

Para estudiar la expresión y producción de proteínas del T6SS_{SPI-6} se utilizaron fusiones transcripcionales y traduccionales de *gfpmut3* a tres componentes estructurales del T6SS_{SPI-6}: *vgrG* (*STM14_0338*), *hcp1* (*STM14_0324*) y *hcp2* (*STM14_0327*). La construcción de estas fusiones se basó el método descrito por Gerlach *et al.* (2007), el cual sucintamente consiste en la recombinación homóloga de un producto de PCR que codifica el marco de lectura *gfpmut3* y un *cassette* de resistencia a Cm, con un gen de interés (sección 2.8). Como se observa en la Figura 12a, una fusión transcripcional corresponde al acoplamiento del reportero *gfpmut3* al promotor de un gen de interés, por ejemplo *vgrG*, permitiendo así evaluar la actividad de éste al transcribirse un mRNA que codifica *gfpmut3* y posteriormente generándose la proteína reportera. Utilizando esta metodología, se obtuvieron cepas que contienen las fusiones transcripcionales *vgrG::gfp* (MTM1306), *hcp1::gfp* (MTM1309) y *hcp2::gfp* (MTM1312), las cuales fueron verificadas mediante PCR utilizando un partidor que se aparea con parte de la región insertada y otro que se aparea con una región cromosomal adyacente (Figura 12).

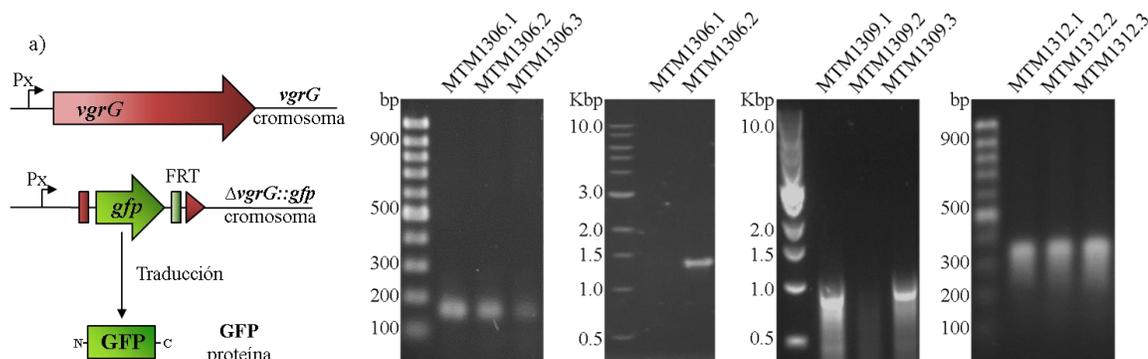


Figura 12. Representación esquemática y confirmación de la construcción de fusiones transcripcionales a *gfp*. (a) Representación esquemática de una fusión transcripcional al reportero *gfp*. (b, c, d y e) Productos de PCR para la confirmación de clones con fusiones transcripcionales de *gfp* a *vgrG*, *hcp1* y *hcp2*, resueltos por electroforesis en gel 1,5% agarosa. (b) *vgrG::gfp* (Cm^R; MTM1306) amplificada con partidores P1_inv y VgrG_FoK1R_bpts. Producto: ~140 pb. (c) *vgrG::gfp* (Cm^R; MTM1306), con partidores 8_T6SS_SPI6_for y GFP_LZ01_Check_Rev. Producto: ~1360 pb. (d) *hcp1::gfp* (Cm^R; MTM1309), con partidores P1_inv y 4_T6SS_SPI6_rev. Producto: ~900 pb. (e) *hcp2::gfp* (Cm^R; MTM1312), con partidores P1_inv y HCP327_rev. Producto: ~330 pb.

Por otra parte, una fusión traduccional corresponde a la extensión de un ORF cualquiera, por ejemplo *VgrG*, debido a la adición del marco de lectura de *gfpmut3*. La traducción de esta construcción origina una proteína *VgrG* con un dominio GFP adicional en su extremo carboxilo (Figura 13a). Esta construcción nos permite evaluar la traducción de un mRNA de interés. Con este fin, se construyó una cepa que contuviera la fusión traduccional *vgrG-gfp* (MTM1300), la cual fue verificada por PCR usando un partidor que se aparea con parte de la región insertada y otro que se aparea con una región cromosomal adyacente (Figura 13).

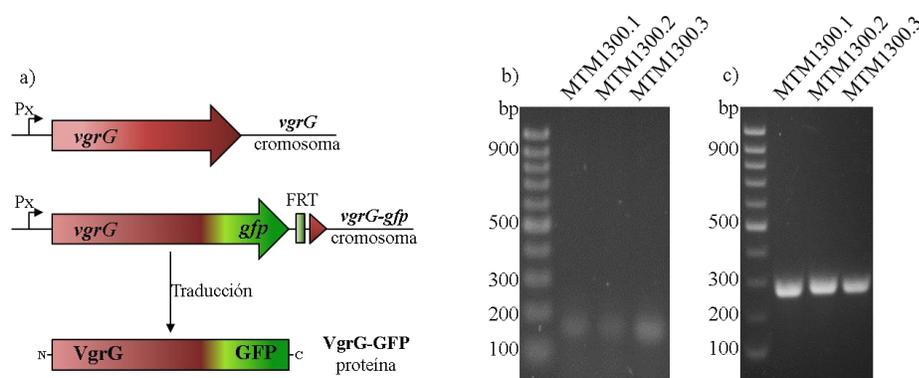


Figura 13. Representación esquemática y confirmación de la construcción de fusiones traduccionales a *gfp*. (a) Representación esquemática de una fusión traduccional al reportero *gfp*. (b y c) Productos de PCR para la confirmación de clones con una fusión traduccional de *gfp* a *vgrG*, resueltos por electroforesis en gel 1,5% agarosa. (b) *vgrG-gfp* (Cm^R; MTM1300) amplificadas con partidores P1_iny y VgrG_FoK1R_bpts. Producto: ~140 pb. (c) *vgrG-gfp* (Cm^R; MTM1300) amplificadas con partidores VgrG_SPI6_Out5_check y GFP_LZ01_Check_Rev. Producto: ~265 pb.

Adicionalmente se construyó la cepa MTM1305, la cual contiene la fusión traduccional *ssaG-gfp*. La proteína *SsaG* corresponde a un elemento estructural del T3SS de la isla SPI-2 cuya expresión en el interior de macrófagos ha sido reportada anteriormente, por lo que se utilizó como control positivo de la técnica. Antes de realizar la eliminación del *cassette* de resistencia, se transdujeron las fusiones a un *background* genético limpio utilizando el bacteriófago P22. Posteriormente, mediante susceptibilidad de las cepas al antibiótico Cm se verificó la eliminación de los *cassettes* de resistencia y la obtención de las mutantes MTM1302, MTM1308, MTM1311 y MTM1314, respectivamente.

Para analizar la producción de los componentes del T6SS_{SPI-6} de las cepas que codifican fusiones al reportero *gfpmut3*, se realizaron ensayos de infección *in vitro* de líneas celulares de macrófagos murinos (RAW264.7) y aviares (HD11) y se analizó la producción de GFP a distintos tiempos luego de ocurrida la infección. Adicionalmente, las cepas fueron transformadas con el plasmidio pmCherry para detectar la presencia de bacterias.

En primera instancia, mediante el análisis de las cepas que contienen fusiones al reportero *gfpmut3* se evaluó si los componentes estructurales del T6SS_{SPI-6} se expresaban en condiciones de cultivo *in vitro*. Para esto, las fusiones transcripcionales *vgrG::gfp* (MTM1308), *hcp1::gfp* (MTM1311) y *hcp2::gfp* (MTM1314) se cultivaron en DMEM-FBS durante 20 h, en condiciones de cultivo celular. Como se observa en la Figura 14, ninguna de estas cepas expresó las fusiones transcripcionales a componentes estructurales del T6SS a GFP en estas condiciones.

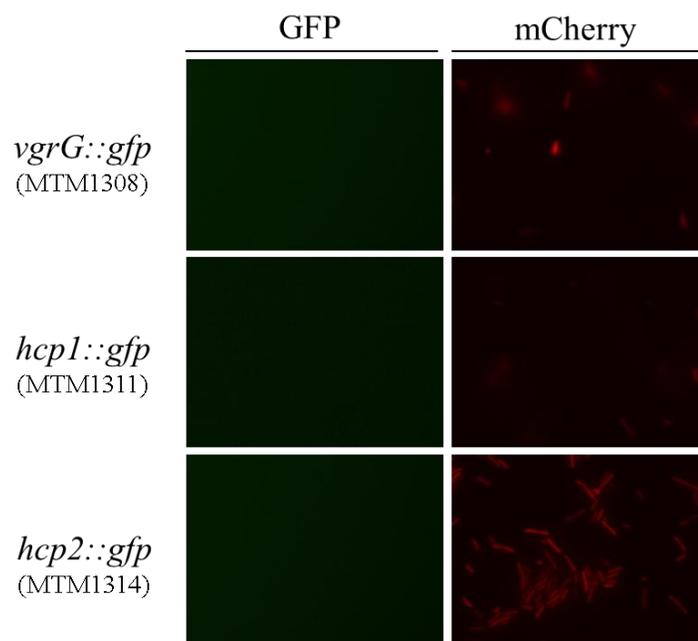


Figura 14. Los componentes del T6SS_{SPI-6} no se expresan en medio de cultivo celular. En la figura se observa la ausencia de expresión de las fusiones transcripcionales *vgrG::gfp* (MTM1308), *hcp1::gfp* (MTM1311) y *hcp2::gfp* (MTM1314) crecidas en medio de cultivo DMEM-FBS por 20 h. Todas las cepas se transformaron con el plasmidio pmCherry. Las cepas se analizaron mediante microscopía de epifluorescencia utilizando filtros para la observación de las proteínas GFP y mCherry.

Una vez confirmado que no hay expresión *in vitro* de los genes *vgrG*, *hcp1* y *hcp2*, se analizó la expresión de las fusiones transcripcionales a distintas horas post-infección en los macrófagos. Para esto, se utilizaron dos líneas celulares de distinto origen animal: RAW264.7 y HD11. Las células RAW 264.7 corresponden a un modelo de estudio *in vitro* derivado de ratones BALB/c, ampliamente utilizado en el análisis de internalización y supervivencia de *Salmonella*. La segunda es una de las pocas líneas celulares de macrófagos aviares derivadas de células hematopoyéticas.

Una vez obtenidas las muestras, mediante microscopía se realizó un recuento de macrófagos que contuvieran bacterias donde había producción de las fusiones a GFP (GFP⁺), en alrededor de 5 campos representativos para cada tiempo y cepa. Como se observa en la Figura 15, la transcripción de los componentes estructurales del T6SS_{SPI-6} ocurre desde estadios tempranos de la infección, pudiendo ser detectadas en una baja (aprox. 5 macrófagos GFP⁺ /100 macrófagos) pero constante población de macrófagos desde 1 h hasta 24 h post-infección, tanto en los macrófagos murinos como aviares. En las Figuras 16 y 17 se observa la expresión de cada una de las fusiones a GFP de los componentes del T6SS_{SPI-6} en el interior de monocapas de los macrófagos murinos y aviares, respectivamente.

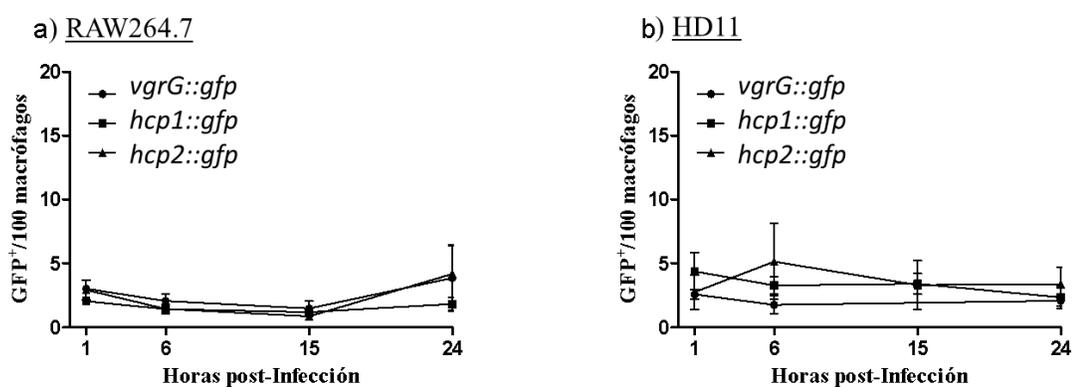


Figura 15. Detección de la transcripción de componentes del T6SS_{SPI-6} fusionados a *gfp* en el interior de macrófagos murinos y aviares. En la figura se observa una cuantificación del número de macrófagos RAW264.7 (A) y HD11 (B) que contenían fluorescencia verde en su interior (GFP⁺) producto de la transcripción de fusiones transcripcionales de componentes del T6SS_{SPI-6} al reportero fluorescente, a cuatro tiempos post-infección. Las monocapas fueron infectadas con las cepas *vgrG::gfp* (MTM1308), *hcp1::gfp* (MTM1311) y *hcp2::gfp* (MTM1314), transformadas con el plasmidio pmCherry.

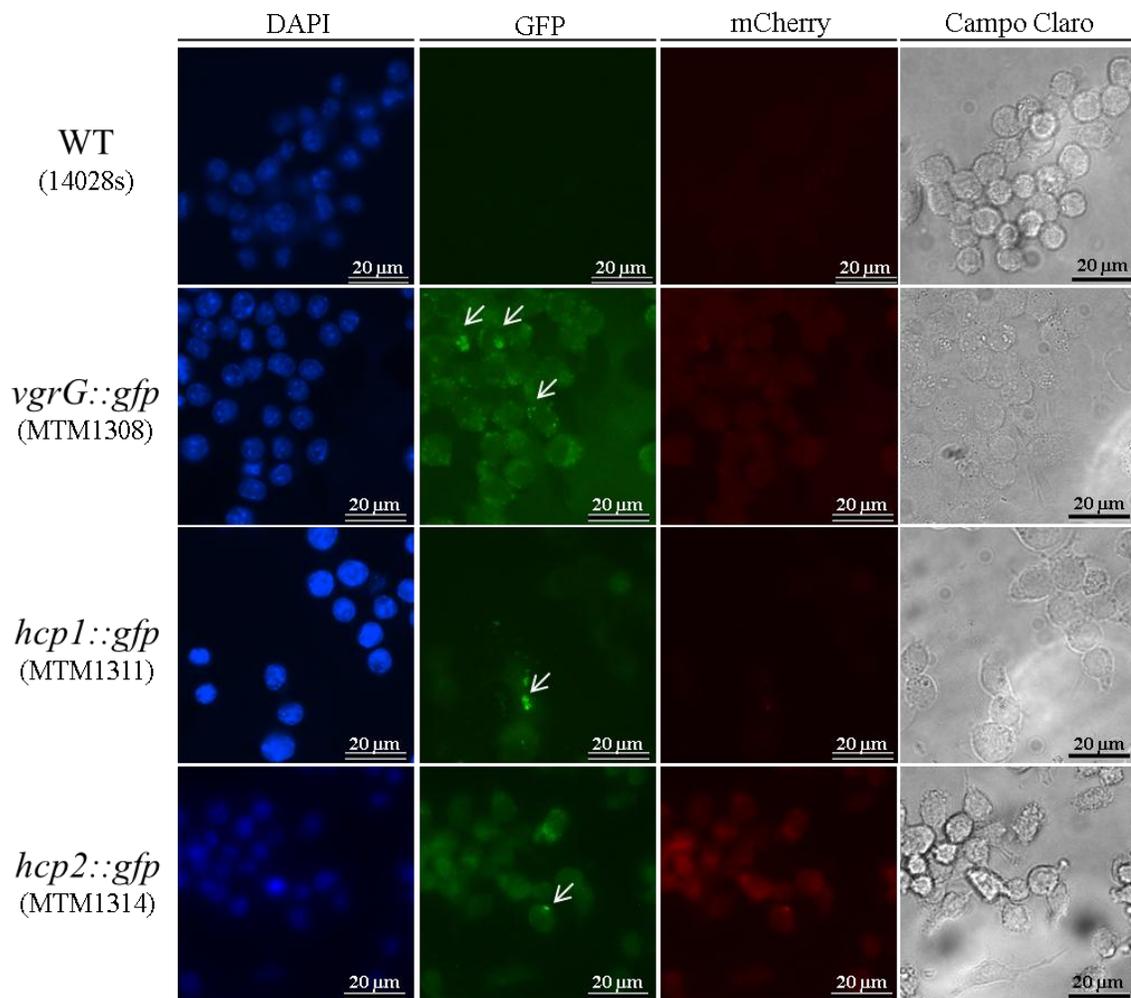


Figura 16. Presencia de expresión de componentes del T6SS_{SPI-6} de *S. Typhimurium* en el interior de macrófagos murinos. En la figura se observan monocapas de macrófagos RAW264.7 infectados con la cepa silvestre 14028s (Control negativo) y las fusiones transcripcionales *vgrG::gfp* (MTM1308), *hcp1::gfp* (MTM1311) y *hcp2::gfp* (MTM1314), transformadas con el plasmidio pmCherry. Las flechas blancas indican la posición de bacterias que expresan GFP.

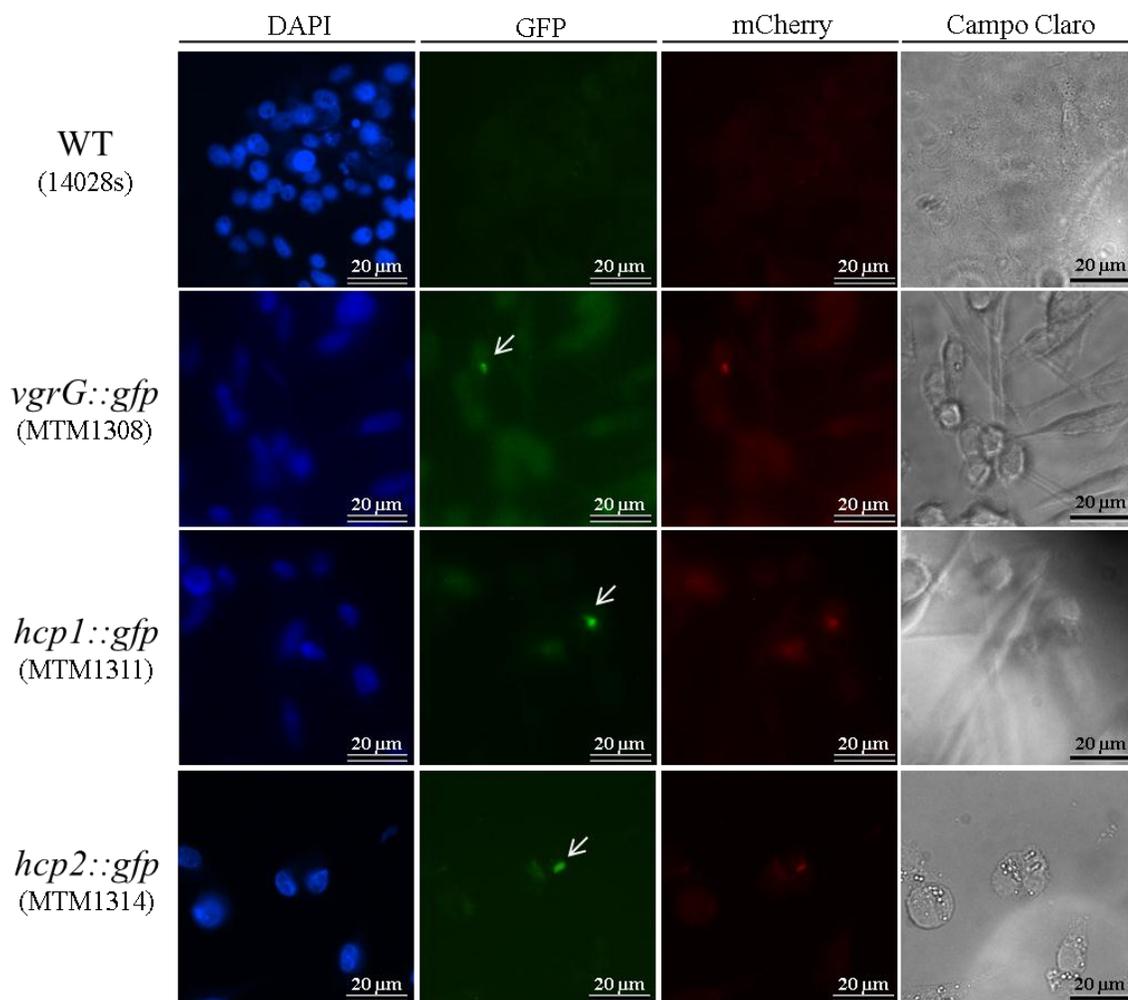


Figura 17. Presencia de expresión de componentes del T6SS_{SPI-6} de *S. Typhimurium* en el interior de macrófagos aviarios. En la figura se observan monocapas de macrófagos RAW264.7 infectados con la cepa silvestre 14028s (Control negativo) y las fusiones transcripcionales *vgrG::gfp* (MTM1308), *hcp1::gfp* (MTM1311) y *hcp2::gfp* (MTM1314), transformadas con el plasmidio pmCherry. Las flechas blancas indican la posición de bacterias que expresan GFP.

Debido a la existencia de muchos mecanismos de regulación de la síntesis de proteínas a nivel de la traducción de los mRNA, fue necesario analizar la síntesis de los componentes del T6SS_{SPI-6} que están siendo expresados en el interior de macrófagos. Para esto se analizó la síntesis de una fusión traduccional de *gfp* a *vgrG*, a distintas horas post-infección en los macrófagos.

Como se observa en la Figura 18, la síntesis de VgrG fue detectada rápidamente una vez ocurrida la infección, en el mismo bajo porcentaje de la población de macrófagos observado anteriormente para la transcripción de *vgrG*. En las Figuras 19 y 20 se observan imágenes representativas de monocapas de macrófagos murinos y aviáres, respectivamente, infectados con cepas que sintetizan componentes del T6SS_{SPI-6} de *S. Typhimurium* durante la infección.

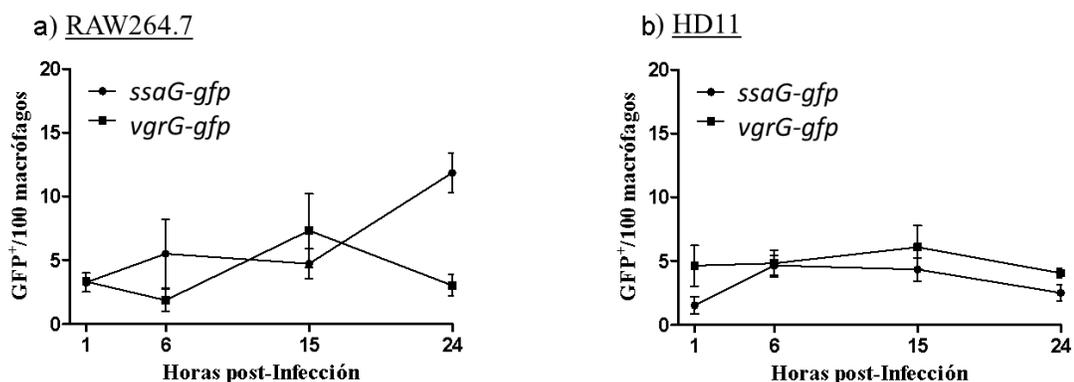


Figura 18. Detección de la síntesis de componentes del T6SS_{SPI-6} fusionados a *gfp* en el interior de macrófagos murinos y aviáres. En la figura se observa una cuantificación del número de macrófagos RAW264.7 (A) y HD11 (B) que contenían fluorescencia verde en su interior (GFP⁺) producto de la síntesis de fusiones traduccionales de componentes del T6SS_{SPI-6} al reportero fluorescente, a cuatro tiempos post-infección. Las monocapas fueron infectadas con las cepas *ssaG-gfp* (MTM1305) y *vgrG-gfp* (MTM1302), transformadas con el plasmidio pmCherry.

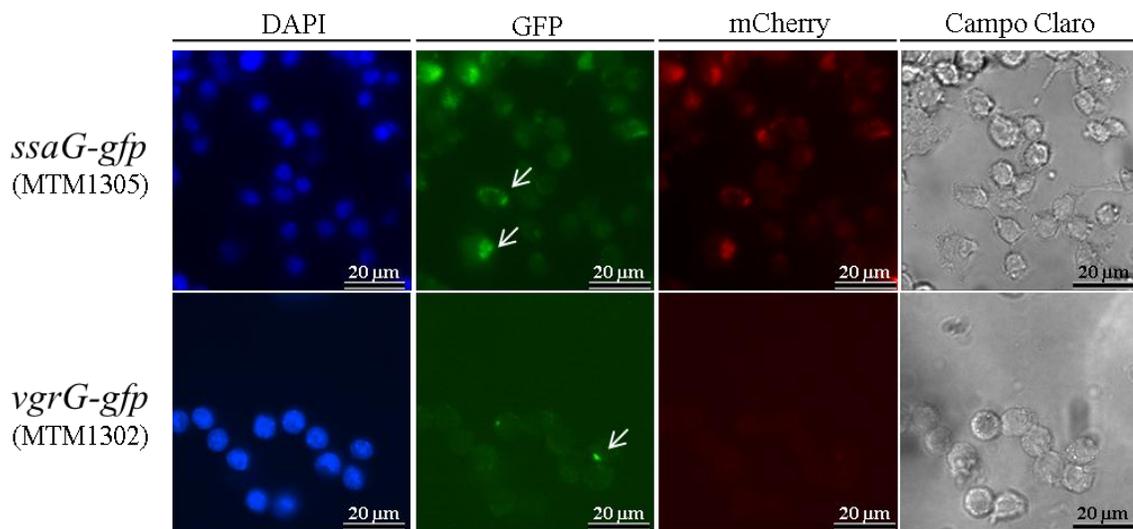


Figura 19. Presencia de síntesis de componentes del T6SS_{SPI-6} de *S. Typhimurium* en el interior de macrófagos murinos. En la figura se observan monocapas de macrófagos RAW264.7 infectados con fusiones traducciónales *ssaG-gfp* (Control positivo; MTM1305) y *vgrG-gfp* (MTM1302), transformadas con el plasmidio pmCherry. Las flechas blancas indican la posición de bacterias que expresan GFP.

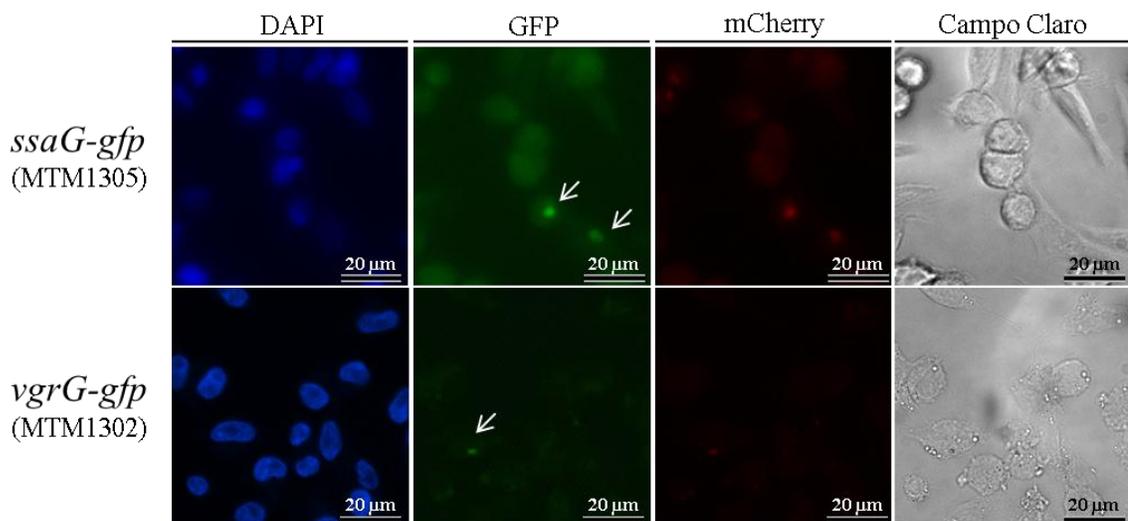


Figura 20. Presencia de síntesis de componentes del T6SS_{SPI-6} de *S. Typhimurium* en el interior de macrófagos aviares. En la figura se observan monocapas de macrófagos HD11 infectados con fusiones traducciónales *ssaG-gfp* (Control positivo; MTM1305) y *vgrG-gfp* (MTM1302), transformadas con el plasmidio pmCherry. Las flechas blancas indican la posición de bacterias que expresan GFP.

Como se observó en este experimento, al entrar las bacterias en contacto con macrófagos murinos o aviares se detecta la presencia de las proteínas de fusión en el interior de macrófagos infectados (Figuras 16, 17, 19 y 20). Es importante destacar que sólo se observa la producción de estas proteínas en un número bajo de los macrófagos infectados y que este bajo porcentaje de la población se mantiene varias horas luego de ocurrida la infección, tanto en macrófagos murinos como aviares (Figuras 15 y 18). Estos resultados indican que los componentes estructurales del T6SS_{SPI-6} de *S. Typhimurium* *hcp1*, *hcp2* y *vgrG* se expresan y traducidos en el interior de macrófagos murinos y aviares, no así en condiciones de cultivo *in vitro* donde estos genes se mantuvieron silenciados.

3.3. Análisis de translocación de la proteína VgrGFT al citoplasma de macrófagos RAW264.7 y HD11

Para determinar si el T6SS codificado en SPI-6 de *S. Typhimurium* es funcional durante la infección, se utilizó una estrategia experimental que permite evidenciar posible la translocación de un componente estructural del T6SS al citoplasma de macrófagos murinos o aviáres. Ésta consiste en generar una proteína del T6SS fusionada a una β -lactamasa que, si es translocada al citoplasma de células infectadas, altera las propiedades fluorogénicas de la cefalosporina CCF2 incorporada por macrófagos desde el medio de cultivo (Figura 21).

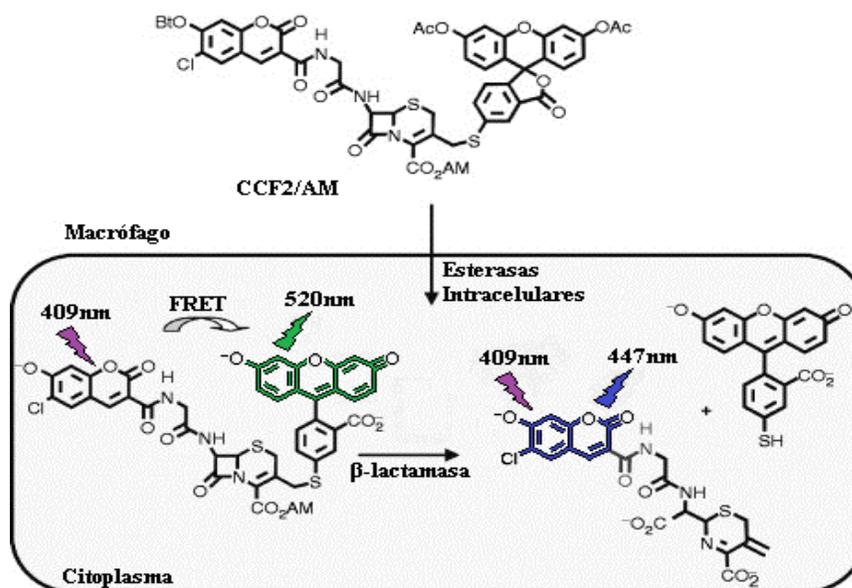


Figura 21. Representación esquemática del ensayo de pérdida de FRET. El sustrato CCF2/AM (forma lipofílica de CCF2) atraviesa la membrana de macrófagos y rápidamente es procesado por esterasas intracelulares generando la forma aniónica CCF2. Al exponer las células a luz de 409 nm, se excita el fluoróforo de la cefalosporina y transfiere su energía al fluoróforo de la fluoresceína, emitiendo luz de 520 nm (verde) al volver a su estado basal. Cuando se translocan proteínas fusionadas a β -lactamasa al citoplasma, se degrada la cefalosporina y cambia la distancia entre los fluoróforos de la cefalosporina y la fluoresceína, perdiéndose la capacidad de realizar FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*). Al exponer estas células a luz de 409 nm, se excita el fluoróforo de la cefalosporina y vuelve a su estado basal emitiendo luz de 447 nm (azul).

De acuerdo a distintos modelos propuestos para la estructura del T6SS, la proteína VgrG corresponde a un componente estructural del aparato que es translocado a células blanco cuando el sistema es funcional (Pukatzki *et al.*, 2007; Basler *et al.*, 2012; Figura 2). Considerando estos antecedentes, se clonó el marco de lectura del gen *STM14_0338* de *S. Typhimurium* 14028s, ortólogo de *vgrG* (Folkesson *et al.*, 2002; Boyer *et al.*, 2009), en el plasmidio pFlagTEM1 para producir VgrGFT, una proteína VgrG fusionada por su extremo carboxilo terminal al epítipo 3xFlag y la β -lactamasa TEM1 (Figura 22).

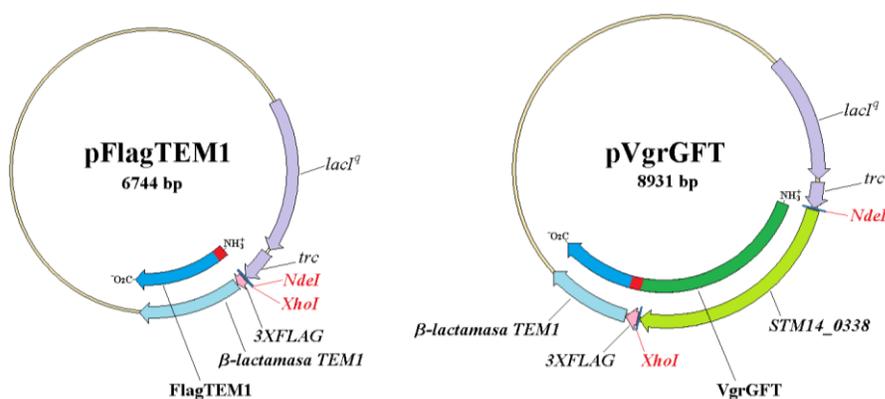


Figura 22. Representación esquemática de los vectores pFlagTEM1 y pVgrGFT. El plasmidio pFlagTEM1 contiene el promotor inducible *trc* cuya actividad permite la producción de FlagTEM1 (β -lactamasa TEM1 sin péptido líder, fusionada a epítipo 3xFlag y sitio de múltiple clonamiento en extremo amino terminal). El plasmidio pVgrGFT es producto del clonamiento de *STM14_0338* sin codón de término entre los sitios de restricción de las enzimas *NdeI* y *XhoI*.

El plasmidio pVgrGFT se introdujo en *E. coli* DH5 α por electrotransformación y mediante PCR de colonias se analizaron distintas transformantes utilizando una pareja de partidores que se aparean con una región interna de *STM14_0338* y con una región de pFlagTEM1 adyacente al sitio de inserción (Figura 23a). Como se muestra en la Figura 23b, los cuatro clones seleccionados resultaron positivos al analizar la presencia del ORF de *STM14_0338* en el sitio de multiple clonamiento (*mcs*). Además se analizó mediante PCR que el tamaño de la región integrada en el *mcs* correspondiera al tamaño del ORF de *STM14_0338* (~2500bp), usando una pareja de partidores que flanquea el sitio de inserción (Figura 23a). Debido a que ninguno de los clones analizados por PCR de colonias generó el producto

esperado, se extrajo DNA plasmidial de uno de los clones y se repitió la reacción de PCR con pVgrGFT purificado (Figura 23c). Como se observa en la Figura 23c al analizar el plasmidio pVgrGFT purificado, se confirmó la integración del ORF de *STM14_0338* al obtener el producto de PCR esperado (~2500bp).

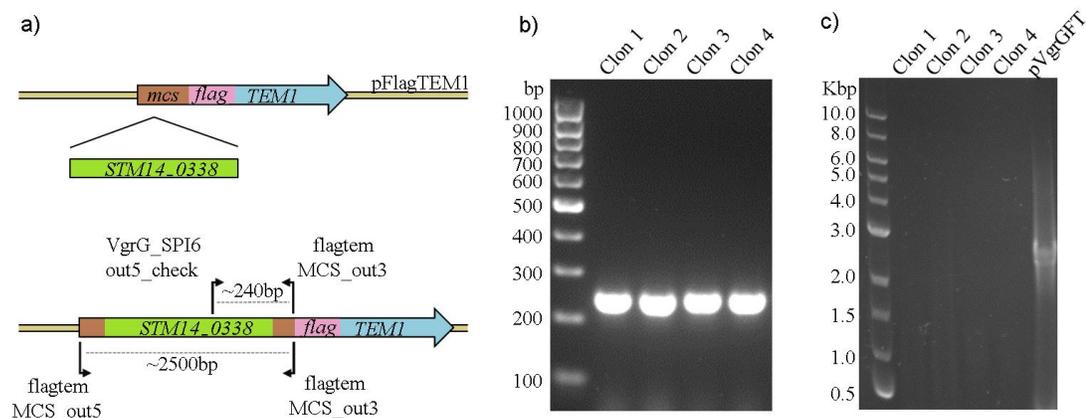


Figura 23. Confirmación mediante PCR de la construcción de pVgrGFT. (a) Representación esquemática de la inserción del marco de lectura del gen *STM14_0338* en el plasmidio pFlagTEM1 y su verificación mediante PCR. (b) Electroforesis en gel 2% agarosa de los productos de PCR generados con los partidores VgrG_SPI6_out5_check y flagtem_MCS_out3. Tamaño esperado del producto: ~240 pb. (c) Electroforesis en gel 0,7% de los productos de PCR generados con los partidores flagtem_MCS_out5 y flagtem_MCS_out3. Los cuatro primeros carriles corresponden al análisis por PCR de colonias de los clones 1, 2, 3 y 4. El carril pVgrGFT corresponde a producto de PCR utilizando como templado DNA plasmidial extraído del clon 1. Tamaño esperado del producto: ~2500 pb.

Para evaluar que el vector recombinante pVgrGFT produce la proteína VgrGFT, se analizaron los perfiles proteicos de los clones 1 y 2, previamente verificados por PCR. En un perfil electroforético teñido con azul de Coomassie (Figura 24a) se observa que al inducir la expresión de *vgrGFT* con IPTG, en los clones 1 y 2 aumenta considerablemente la intensidad de una banda entre los estándares de 130 KDa y 100 KDa. Esta banda, que puede corresponder a VgrGFT (109,4 KDa), desaparece al reprimir la expresión con glucosa y tampoco se observa en la cepa parental ni en transformantes que contienen pFlagTEM1. La determinación del epítipo 3xFlag mediante Western blot permitió observar que al inducir con IPTG hay una fuerte señal cercana al tamaño de la proteína VgrGFT, además de bandas de menor tamaño que no se

observan en la cepa parental y que desaparecen de los clones 1 y 2 al reprimir con glucosa. Si bien la represión con glucosa disminuye considerablemente la producción del epítipo 3xFlag, en las transformantes persiste una señal muy definida cercana al tamaño esperado para VgrGFT. En transformantes que contienen pFlagTEM1 inducidas con IPTG se observa una banda cercana al tamaño de la proteína FlagTEM1 (32,4 KDa) acompañada de bandas de menor tamaño. Estos resultados fueron observados tanto en las cepas DH5 α , DH5 α /pFlagTEM1 y DH5 α /pVgrGFT, como en las cepas 14028s, 14028s/pFlagTEM1 y 14028s/pVgrGFT (Figura 24).

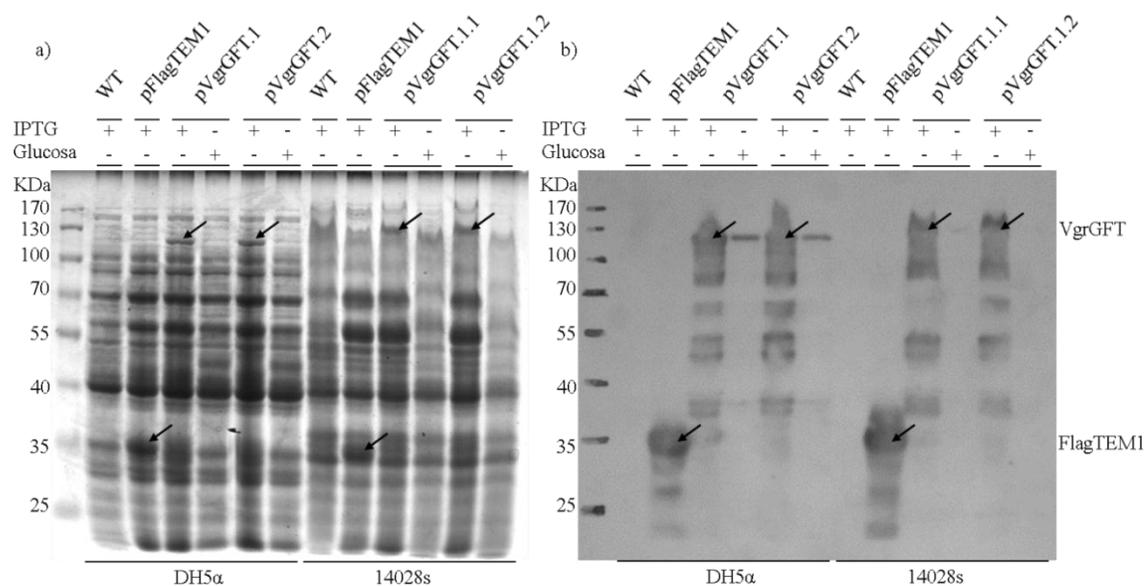


Figura 24. Producción *in vitro* de VgrG fusionado a FlagTEM1 en transformantes de *E. coli* DH5 α y *S. Typhimurium* 14028s que contienen los plasmidios pFlagTEM1 o pVgrGFT. (a) Perfil electroforético de proteínas realizado por SDS-PAGE y revelado con azul de Coomassie. (b) Inmunodetección del epítipo 3xFlag, revelada por quimioluminiscencia sobre película fotográfica. En la parte superior se indican las cepas cargadas en cada carril, donde WT es la cepa silvestre, pFlagTEM1 es WT/pFlagTEM1, pVgrGFT.1 y pVgrGFT.2 son los clones 1 y 2 de DH5 α /pVgrGFT, pVgrGFT1.1 y pVgrGFT1.2 son los clones 1 y 2 de 14028s transformada con pVgrGFT purificado de pVgrGFT.1. Además, en la parte superior se indican las cepas que fueron suplementadas con 1 mM IPTG o 1% glucosa. Las flechas negras en la imagen indican la posición de las bandas correspondientes a las proteínas VgrGFT (109,4 KDa) y FlagTEM1 (32,4 KDa) inducidas.

Para estudiar la funcionalidad del T6SS, se realizaron ensayos de translocación de VgrGFT al citoplasma de macrófagos RAW264.7 y HD11 a tiempos tempranos (2 h post internalización) y tiempos tardíos (15 h post internalización), los que fueron analizados mediante microscopía de epifluorescencia. Se utilizaron las cepas 14028s/pSipAFT (control positivo), 14028s/pFlagTEM1 (control negativo) y 14028s/pVgrGFT. El plasmidio pSipAFT es un derivado de pFlagTEM1 que produce la proteína SipA fusionada a la β -lactamasa TEM1. Ésta se utiliza como control positivo de translocación, pues SipA corresponde a un efector del T3SS codificado en SPI-1 cuya translocación al citoplasma de macrófagos ha sido descrita en la literatura (Raffatellu *et al.* 2005).

Como se muestra en la Figura 25, en los macrófagos murinos (RAW264.7) y aviares (HD11) cargados con el sustrato CCF2 se observa una fuerte fluorescencia de 520 nm (verde) y una nula o despreciable fluorescencia de 447 nm (azul) debido a la incapacidad de estas células para degradar el anillo β -lactámico de CCF2. Esta baja señal de fluorescencia de 447 nm también se observó en macrófagos RAW264.7 y HD11 infectados con la cepa 14028s/pFlagTEM1 (control negativo), indicando que la proteína FlagTEM1 permanece en el interior de las bacterias tanto a tiempos tempranos (Figuras 26 y 28) como a tiempos tardíos (Figuras 27 y 29) de infección. Por otra parte, se observó una intensa señal de 447 nm en macrófagos infectados con la cepa 14028s/pSipAFT (control positivo), indicando que la translocación de la construcción SipAFT es detectada mediante esta metodología en ambos tipos celulares, tanto a tiempos tempranos (Figuras 26 y 28) como a tiempos tardíos (Figuras 27 y 29) de infección. El análisis de distintos campos con células RAW264.7 y HD11 infectadas con la cepa 14028s/pVgrGFT indicó la ausencia de una población de células que degradara el sustrato CCF2 debido a la translocación de VgrGFT, tanto a tiempos tempranos (Figuras 26 y 28) como a tiempos tardíos (Figuras 27 y 29).

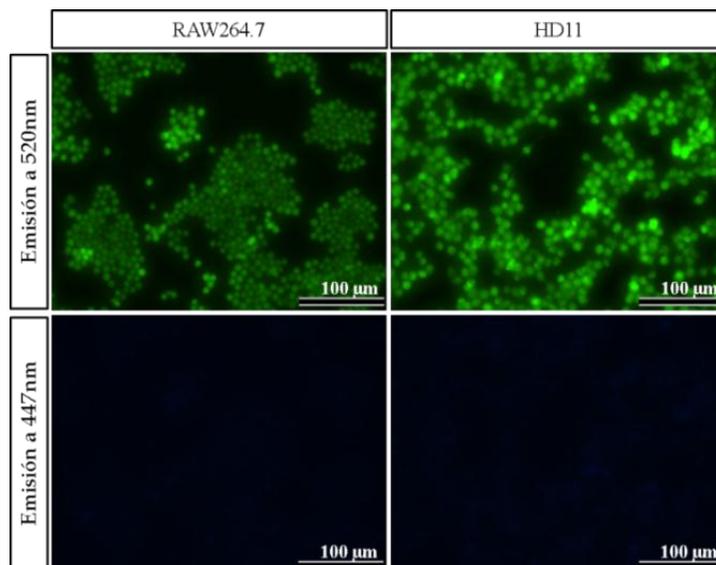


Figura 25. Sustrato CCF2 sin hidrolizar en el interior de macrófagos murinos y aviáres sin infectar. En la figura se observan monocapas de macrófagos murinos (RAW264.7) y aviáres (HD11) sin infectar, cargadas con el sustrato fluorogénico CCF2. Las columnas corresponden a un campo representativo de la muestra, analizado con filtros para luz de 520 nm y filtros para luz de 447 nm.

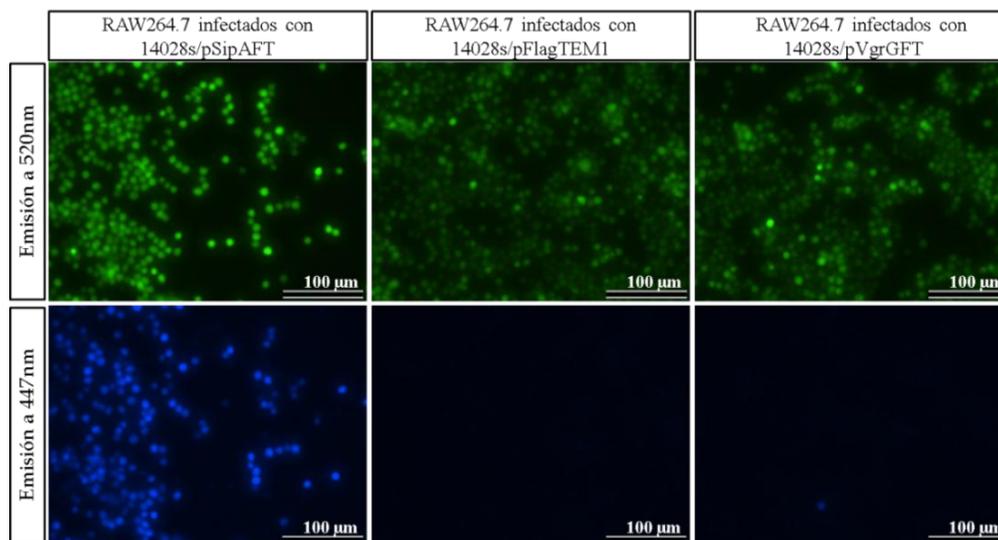


Figura 26. Translocación de SipAFT y ausencia de translocación de VgrGFT al citosol de macrófagos murinos luego de 2 h de infección. En la figura se observan monocapas de macrófagos RAW264.7 cargadas con CCF2 e infectadas con las cepas 14028s/pSipAFT, 14028s/pFlagTEM o 14028s/pVgrGFT. Las columnas corresponden a un campo representativo de la muestra, analizado con filtros para luz de 520 nm y 447 nm.

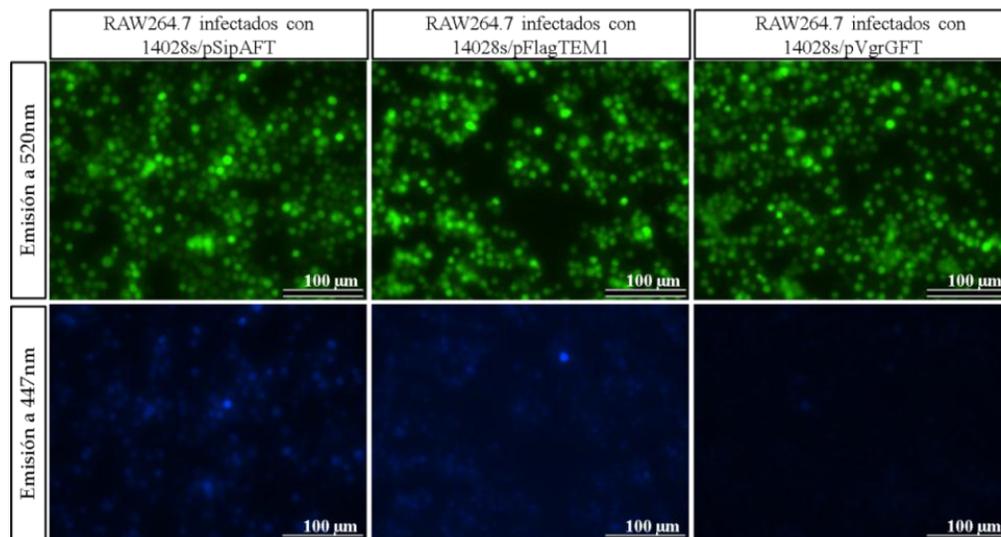


Figura 27. Translocación de SipAFT y ausencia de translocación de VgrGFT al citosol de macrófagos murinos luego de 15 h de infección. En la figura se observan monocapas de macrófagos RAW264.7 cargadas con CCF2 e infectadas con las cepas 14028s/pSipAFT, 14028s/pFlagTEM y 14028s/pVgrGFT. Las columnas corresponden a un campo representativo de la muestra, analizado con filtros para luz de 520 nm y 447 nm.

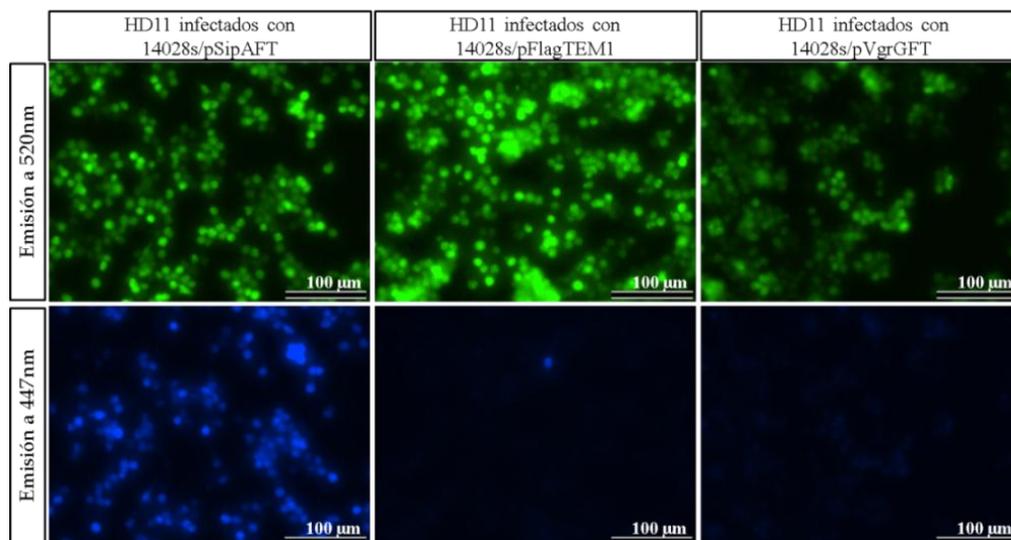


Figura 28. Translocación de SipAFT y ausencia de translocación de VgrGFT al citosol de macrófagos aviares luego de 2 h de infección. En la figura se observan monocapas de macrófagos HD11 cargadas con CCF2 e infectadas con las cepas 14028s/pSipAFT, 14028s/pFlagTEM y 14028s/pVgrGFT. Las columnas corresponden a un campo representativo de la muestra, analizado con filtros para luz de 520 nm y 447 nm.

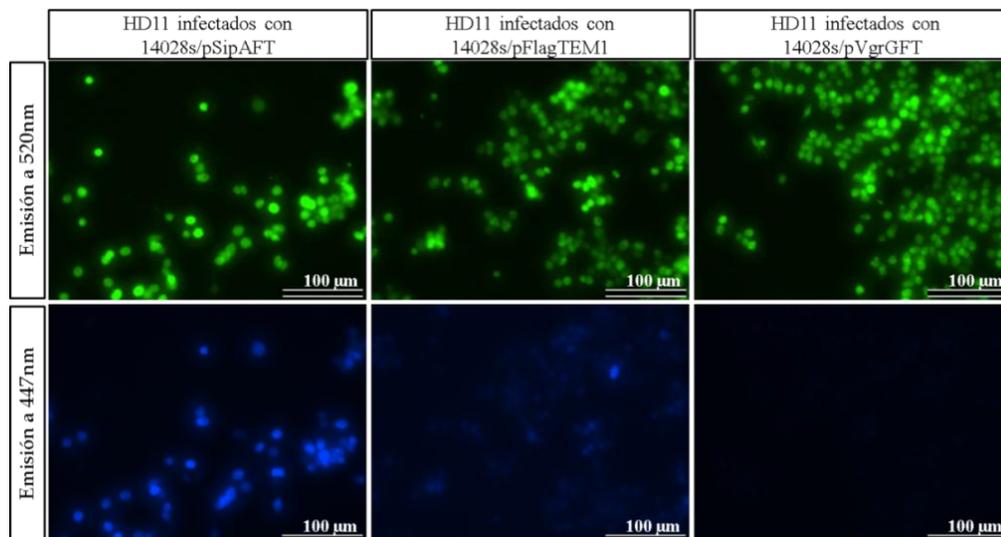


Figura 29. Translocación de SipAFT y ausencia de translocación de VgrGFT al citosol de macrófagos aviares luego de 15 h de infección. En la figura se observan monocapas de macrófagos HD11 cargadas con CCF2 e infectadas con las cepas 14028s/pSipAFT, 14028s/pFlagTEM y 14028s/pVgrGFT. Las columnas corresponden a un campo representativo de la muestra, analizado con filtros para luz de 520 nm y 447 nm.

Debido a que la observación por microscopía entrega un resultado cualitativo, se repitió el análisis de células RAW264.7 y HD11 infectadas con las cepas en estudio utilizando esta vez un fluorímetro de placa para determinar cuantitativamente el nivel de translocación en toda la monocapa de macrófagos infectados. Este análisis se realizó 2 h post infección, cambiando el sustrato CCF2-AM por un análogo más estable (CCF4-AM). Además, para asegurar la permanencia del sustrato procesado en el interior de cada célula se utilizó el inhibidor no específico de transportadores de aniones Probenecid (DiVirgilio *et al.*, 1988). Se utilizaron las cepas WT/pFlagTEM1 (14028s/pFlagTEM1; control negativo), WT/pSipAFT (14028s/pSipAFT; control positivo), $\Delta spi1$ /pSipAFT (MTM1315/pSipAFT; control negativo), WT/pVgrGFT (14028s/pVgrGFT), $clpV^-$ /pVgrGFT (MTM1319/pWSK29/pVgrGFT) y $clpV^+$ /pVgrGFT (MTM1319/pClpV/pVgrGFT).

Al igual que en las imágenes de microscopía, se observó translocación únicamente en la cepa WT/pSipAFT tanto en células murinas como aviares, 2 h post infección (Figuras 30 y 31). Además, este efecto no se observó al utilizar una mutante del T3SS_{SPI-1}, necesario para la

translocación de SipA. Así como en la cepa WT/pVgrGFT, en las mutantes de *clpV* (MTM1319) no se observaron diferencias en el índice de translocación respecto a la cepa WT/pFlagTEM1 en ninguna de las líneas celulares. Los resultados obtenidos por microscopía y fluorimetría indican que la proteína VgrG fusionada a la β -lactamasa TEM1 no es translocada al citoplasma de macrófagos RAW264.7 ni HD11, a tiempos tempranos tras ocurrida la internalización (2 h) así como a tiempos más prolongados (20 h).

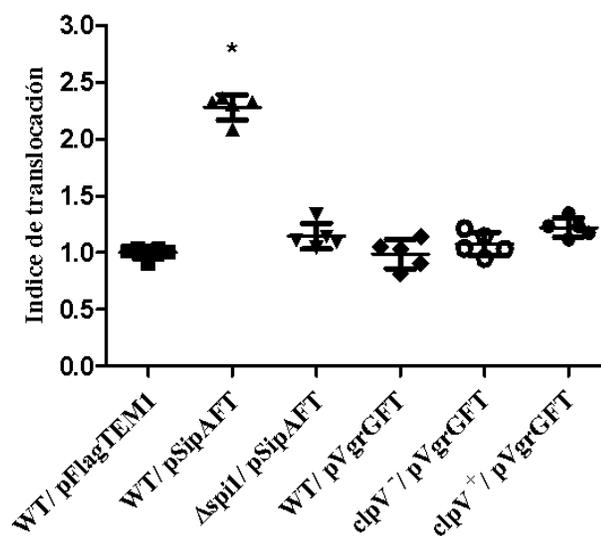


Figura 30. Cuantificación de translocación de SipAFT y ausencia de translocación de VgrGFT al citosol de macrófagos murinos, 2 h post-infección. Se muestran los índices de translocación de cada pocillo, correspondientes a una relación entre la fluorescencia a 447 nm y 520 nm de la monocapas de macrófagos RAW264.7 infectados con las cepas indicadas durante 2 h y cargados con CCF4, normalizada por el control negativo WT/pFlagTEM1. Las barras indican la desviación estándar entre experimentos. * Diferencias significativas respecto a la cepa silvestre ($p < 0.05$, *t*-Student).

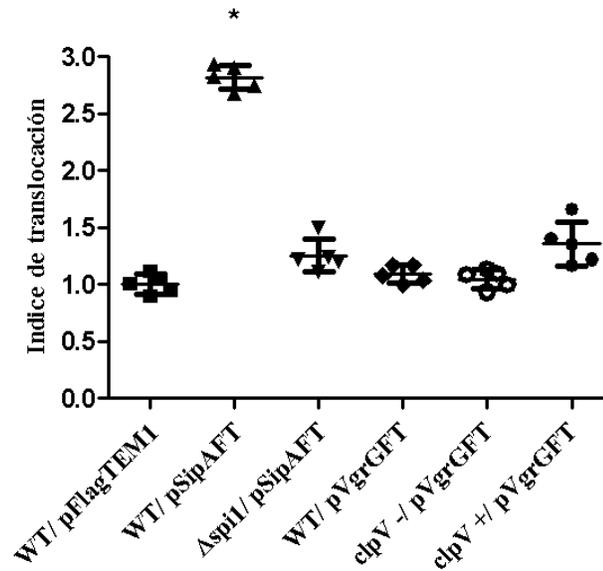


Figura 31. Cuantificación de translocación de SipAFT y ausencia de translocación de VgrGFT al citosol de macrófagos aviáres, 2 h post-infección. Se muestran los índices de translocación de cada pocillo, correspondientes a una relación entre la fluorescencia a 447 nm y 520 nm de la monocapas de macrófagos HD11 infectados con las cepas indicadas durante 2 h y cargados con CCF4, normalizada por el control negativo WT/pFlagTEM1. Las barras indican la desviación estándar entre experimentos. * Diferencias significativas respecto a la cepa silvestre ($p < 0.05$, *t*-Student).

3.4. El T6SS de *S. Typhimurium* contribuye a la invasión de macrófagos murinos y aviáres, pero no así a la supervivencia intracelular

Como se mencionó anteriormente, los estudios referidos al T6SS codificado en la isla genómica SPI-6 eran discrepantes respecto a su contribución en la virulencia de *S. Typhimurium*. El presente año, un artículo del grupo del Dr. Coombes (Mulder *et al.*, 2012) mediante ensayos *in vivo* rectificó la hipótesis de que el T6SS de SPI-6 contribuye a la virulencia de *S. Typhimurium*, resultados que se condicen con los obtenidos por nuestro grupo de trabajo.

Debido a la estrecha interacción que ocurre entre *S. Typhimurium* y células fagocíticas durante la infección, se decidió analizar cómo se afecta la capacidad invasiva y de supervivencia en el interior de macrófagos de *S. Typhimurium* por la presencia o actividad del T6SS_{SPI-6}. Para este fin, en este trabajo se construyeron mutantes no polares con deleciones del gen ortólogo de *clpV* (*STM14_0319*) y del *cluster* que contiene todos los componentes del T6SS descritos en la literatura (Boyer *et al.*, 2009; Blondel *et al.* 2009) en la cepa virulenta 14028s. Las mutantes se generaron con el método de Datsenko y Wanner (2000), que consiste en el reemplazo del gen o región de interés en el cromosoma por un *cassette* de resistencia a antibiótico mediante recombinación homóloga. Este *cassette* de resistencia a antibiótico es removido posteriormente, dejando una “cicatriz” FRT que contiene codones de término en los seis marcos de lectura posibles y un sitio de unión para ribosomas, de manera de asegurar la expresión de los genes que se encuentran río abajo de la deleción (Figura 32).

De esta forma, se obtuvieron las mutantes MTM1318 ($\Delta clpV::Cm$) y MTM1316 ($\Delta T6SS_{SPI-6}::Kan$), las cuales fueron verificadas mediante PCR (Figura 33). Posteriormente se eliminaron sus *cassettes* de resistencia para obtener las cepas MTM1319 ($\Delta clpV::FRT$) y MTM1317 ($\Delta T6SS_{SPI-6}::FRT$), que fueron confirmadas mediante el análisis de sensibilidad a los antibióticos Cm y Kan, respectivamente. Además, se utilizó como control la mutante MTM1321 ($\Delta aroA::FRT$), cuya supervivencia en el interior de macrófagos murinos es menor que la de la cepa parental (Stocker *et al.* 1983).

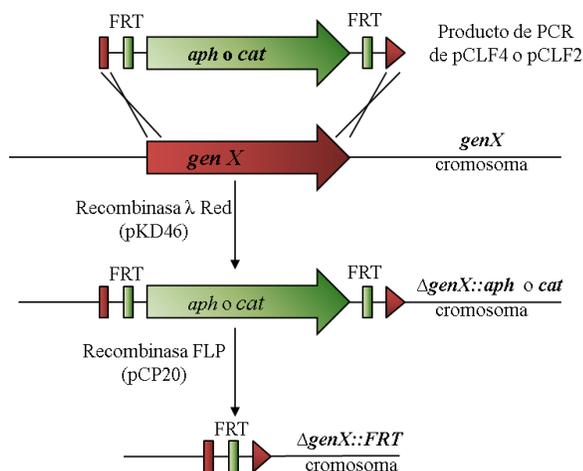


Figura 32. Representación esquemática del método de mutagénesis descrito por Datsenko y Wanner. Generación de una mutación no polar mediante el sistema de reemplazo alélico de un paso descrito por Datsenko y Wanner (2000).

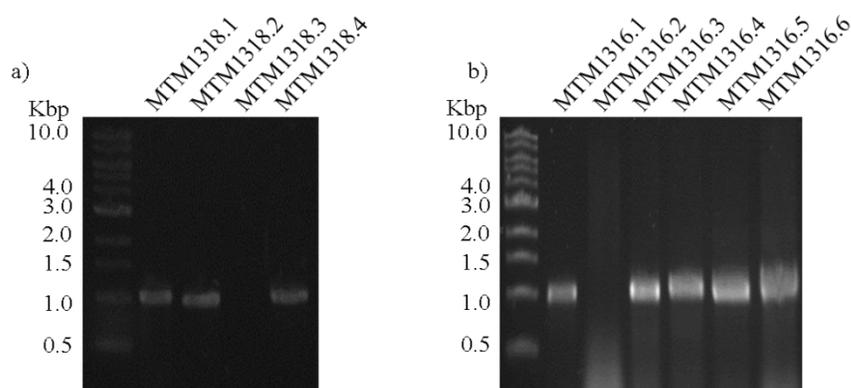


Figura 33. Confirmación por PCR de las mutantes MTM1318 y MTM1316. Productos de PCR resueltos en electroforesis en geles 1% agarosa, para análisis del intercambio alélico por recombinación homóloga en cada mutante. **(a)** Productos de PCR de colonias de MTM1318 ($\Delta clpV::Cm$), con los partidores STM0272_OUT5 y C3. Tamaño de producto esperado: ~ 1000 pb. **(b)** Productos de PCR de colonias de MTM1316 ($\Delta T6SS_{SPI-6}::Kan$) con los partidores SPI-6_OUT5 y K1. Tamaño de producto esperado: ~ 1000 pb.

Para el análisis de la internalización y supervivencia de las mutantes MTM1317 y MTM1319 en los macrófagos se realizaron ensayos de protección con gentamicina.

En las Figuras 34 y 35 se observa que una delección del T6SS_{SPI-6} completo (MTM1317) no generó defectos en la internalización y supervivencia respecto a la cepa parental, tanto en células RAW264.7 como en HD11. Sin embargo, el porcentaje de bacterias internalizadas resultó ser mayor al eliminar el gen que codifica *clpV* (MTM1319). Si bien la cepa MTM1319 alteró el proceso de internalización, no se observaron cambios en su supervivencia en el interior de macrófagos RAW264.7 ni HD11 20 h post-infección. Como se observa en las Figuras 36 y 37, este fenotipo de la mutante del gen *clpV* se repitió en ambos modelos celulares al utilizar la cepa MTM1319 transformada con el vector de expresión pWSK29, sin embargo la complementación en *trans* con el vector pClpV no restauró los niveles de internalización de la mutante a los de la cepa parental.

Estos resultados indican que el T6SS_{SPI-6} de *S. Typhimurium* 14028s no es necesario para la supervivencia en macrófagos murinos y aviáres, contrastando con los recientes resultados reportados por Mulder *et al.* (2012) y Liu *et al.* (2012).

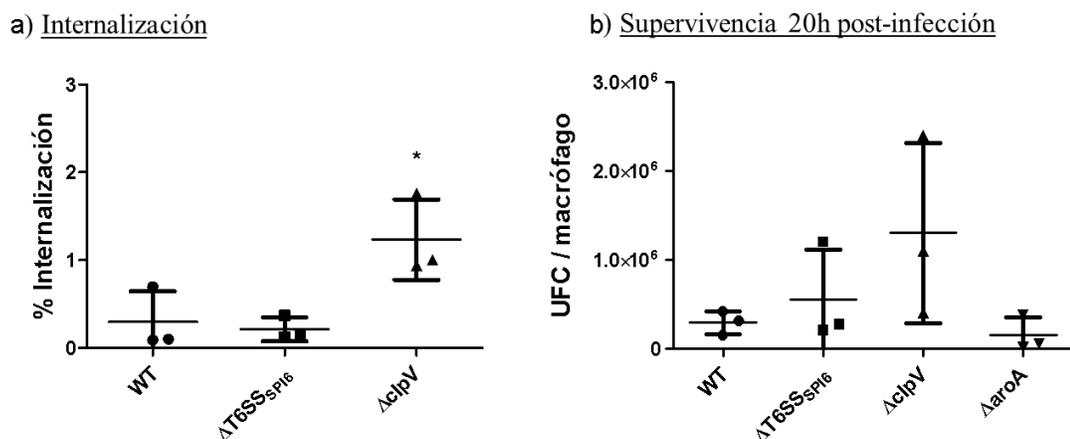


Figura 34. Mutaciones del T6SS_{SPL-6} no disminuyen la supervivencia de cepas en macrófagos murinos, pero mutantes de *clpV* aumentan su internalización. En la figura se muestra la internalización (a) y supervivencia a las 20 h post-infección (b) de las cepas WT (Cepa silvestre), $\Delta T6SS_{SPL-6}$ (MTM1317), $\Delta clpV::FRT$ (MTM1319) y $\Delta aroA::FRT$ (MTM1321). Cada punto representa el promedio de un ensayo (3 a 4 pocillos por ensayo). Las barras indican la desviación estándar entre experimentos. * Diferencias significativas respecto a la cepa silvestre ($p < 0.05$, *t*-Student).

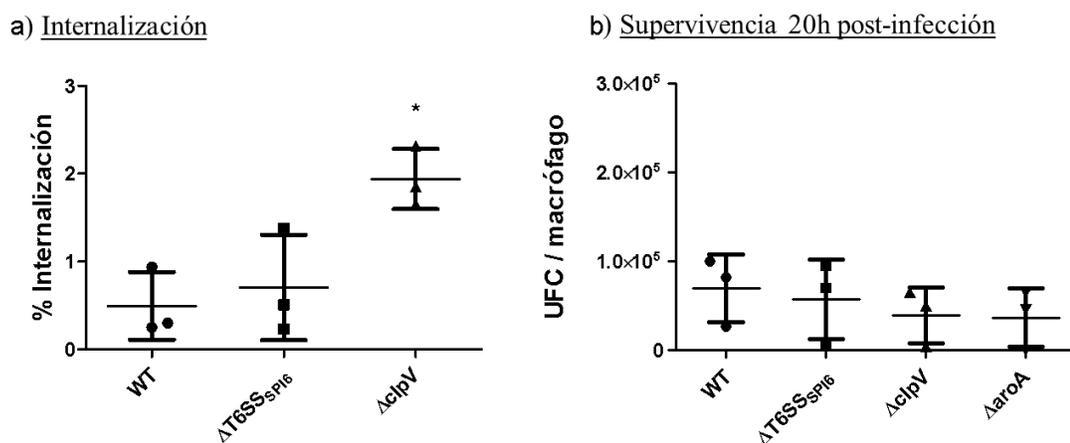


Figura 35. Mutaciones del T6SS_{SPL-6} no disminuyen la supervivencia de cepas en macrófagos aviáres, pero mutantes de *clpV* aumentan su internalización. En la figura se muestra la internalización (a) y supervivencia a las 20 h post-infección (b) de las cepas WT (Cepa silvestre), $\Delta T6SS_{SPL-6}$ (MTM1317), $\Delta clpV::FRT$ (MTM1319) y $\Delta aroA::FRT$ (MTM1321). Cada punto representa el promedio de un ensayo (3 a 4 pocillos por ensayo). Las barras indican la desviación estándar entre experimentos. * Diferencias significativas respecto a la cepa silvestre ($p < 0.05$, *t*-Student).

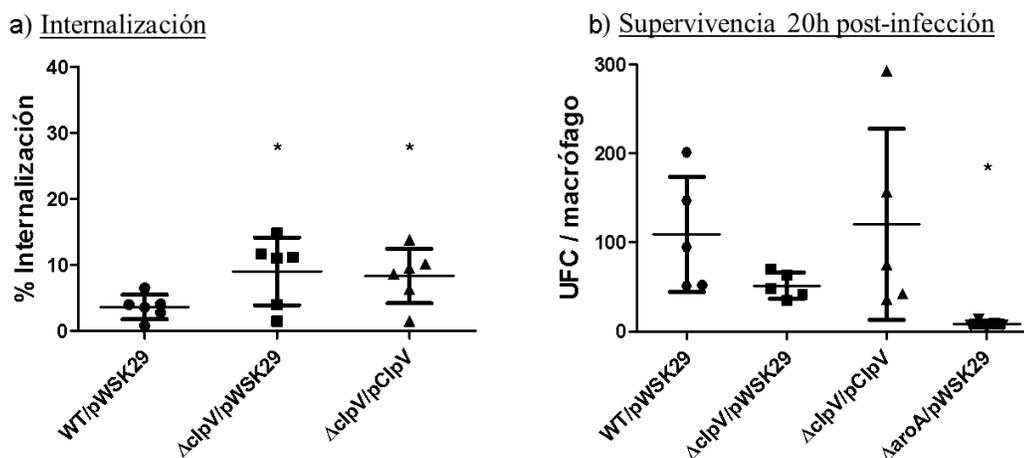


Figura 36. Eliminación de *clpV* aumenta internalización de la cepa a macrófagos murinos sin disminuir su supervivencia, pero fenotipo no es complementado con pClpV. En la figura se muestra la internalización (a) y supervivencia a las 20 h post-infección (b) de las cepas WT/pWSK29 (Cepa silvestre), $\Delta clpV$ /pWSK29 (MTM1319), $\Delta clpV$ /pClpV (MTM1319) y $\Delta araA$ /pWSK29 (MTM1321). Cada punto representa el promedio de un ensayo (3 a 4 pocillos por ensayo). Las barras indican la desviación estándar entre experimentos. * Diferencias significativas respecto a la cepa silvestre ($p < 0.05$, *t*-Student).

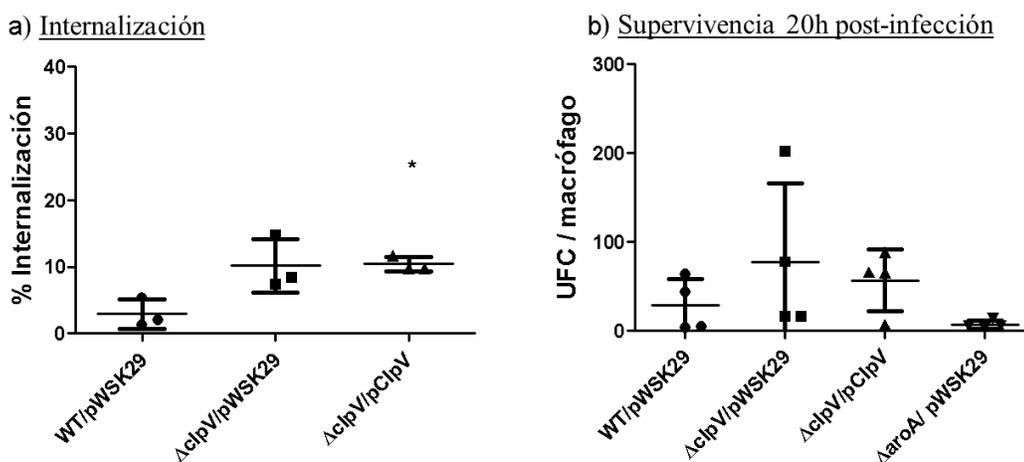


Figura 37. Eliminación de *clpV* aumenta internalización de la cepa a macrófagos aviares sin disminuir su supervivencia, pero fenotipo no es complementado con pClpV. En la figura se muestra la internalización (a) y supervivencia a las 20 h post-infección (b) de las cepas WT/pWSK29 (Cepa silvestre), $\Delta clpV$ /pWSK29 (MTM1319), $\Delta clpV$ /pClpV (MTM1319) y $\Delta araA$ /pWSK29 (MTM1321). Cada punto representa el promedio de un ensayo (3 a 4 pocillos por ensayo). Las barras indican la desviación estándar entre experimentos. * Diferencias significativas respecto a la cepa silvestre ($p < 0.05$, *t*-Student).

4. DISCUSIÓN

Durante los últimos años ha crecido rápidamente el número de estudios referentes a la identificación y caracterización de los T6SS debido a su ubicuidad en bacterias del tipo Gram negativo. Recientemente han sido descritos 5 *clusters* distribuidos diferencialmente en serovares de *Salmonella*, los que codifican para los componentes *core* descritos para los T6SS (Blondel *et al.*, 2009; Boyer *et al.* 2009). A pesar que todos estos *clusters* codifican T6SS, la distinta organización genética y contexto genómico en que se encuentran, apoyan la hipótesis de que han sido adquiridos por eventos de transferencia horizontal independientes durante la evolución de *Salmonella* (Blondel *et al.*, 2009).

Hasta la fecha, los estudios desarrollados en *Salmonella* han reportado la contribución del T6SS codificado en la Isla de Patogenicidad 19 de *Salmonella* SPI-19 (T6SS_{SPI-19}) en la virulencia de los serovares *S. Gallinarum* y *S. Enteritidis* (Blondel *et al.*, 2010). En el caso del serovar *S. Typhimurium*, que carece de la isla genómica SPI-19, se ha descrito un *cluster* que codifica los componentes de un T6SS en la Isla de Patogenicidad 6 de *Salmonella* (T6SS_{SPI-6}), presente además en un gran número de serovares de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* (I) (Blondel *et al.*, 2009). Inicialmente, la vinculación de T6SS_{SPI-6} con la patogénesis de *S. Typhimurium* fue confusa e incluso contradictoria (Klumpp *et al.*, 2007; Parson *et al.*, 2005), sin embargo publicaciones recientes han corroborado su participación en colonización de órganos blandos en el hospedero murino (Mulder *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012). Como se mencionó anteriormente, los trabajos desarrollados en nuestro laboratorio han indicado que el T6SS_{SPI-6} de *S. Typhimurium* 14028s también resulta necesario para la colonización de órganos internos de aves White Leghorn infectadas oralmente (Tesis Doctoral, David Pezoa). Teniendo en cuenta el rol fundamental de los componentes celulares de la barrera inmune del hospedero para limitar la infección generada por *S. Typhimurium*, en este trabajo se investigó la producción y funcionalidad del T6SS_{SPI-6} de *S. Typhimurium* en el interior de macrófagos murinos y aviares, además de su importancia en la internalización y supervivencia intracelular de la bacteria en el mismo.

Para analizar la producción de componentes del T6SS_{SPI-6} se construyeron fusiones al reportero *gfpmut3* (Cormack *et al.*, 1996) codificado en el vector pLZ01, el cual fue construido

durante el desarrollo de esta tesis (Figura 4). A través del uso de fusiones transcripcionales a los genes *STM14_0338*, *STM14_0324* y *STM14_0327* (ortólogos de *hcp1*, *hcp2* y *vgrG* respectivamente), cuyos productos conforman el vástago central y la punta del T6SS (Figura 2), se observó que éstos no se expresan cuando las cepas son crecidas en medio de cultivo DMEM-FBS. Sin embargo, luego de ocurrida la internalización de estas cepas por parte de macrófagos murinos o aviáres, se detectó la actividad de estos genes en una baja población de los macrófagos infectados. De igual manera, al analizar las cepas que contenían fusiones traduccionales se detectó la producción de VgrG fusionado a GFPmut3, lo que indica que los componentes estructurales del T6SS son transcritos y traducidos en el interior de los macrófagos. Los resultados obtenidos a través de esta metodología concuerdan con los recientemente reportados por Mulder *et al.* (2012), quienes indicaron que la producción de las proteínas Hcp1, Hcp2, VgrG se gatilla en el interior de los macrófagos RAW264.7.

Un hecho interesante fue determinar de forma cuantitativa que solamente una subpoblación cercana al 5% de macrófagos infectados contenía bacterias que expresaron las fusiones a *gfpmut3*. Los principales grupos de estudio de T6SS han resuelto esta baja expresión en modelos *in vitro* a través de la búsqueda y utilización de mutantes hipersecretoras para facilitar el estudio de su funcionalidad (Mougous *et al.*, 2006; Basler & Mekalanos *et al.*, 2012; Aubert *et al.*, 2008). Sin embargo, en *Salmonella* aún se desconoce cómo se regula la expresión de los componentes del sistema. La detección del reportero GFP en macrófagos infectados se mantuvo hasta 24 h post infección, sin observar aumentos en los tiempos intermedios. Considerando que GFPmut3 posee una vida media larga ($T_{1/2} > 24$ h; Andersen *et al.*, 1998), a partir de los resultados obtenidos se puede inferir que la expresión y producción de los genes que codifican componentes estructurales del T6SS_{SPI-6} en *S. Typhimurium* ocurrió principalmente en los primeros instantes luego de la infección y que posteriormente los niveles de la proteína se mantuvieron constantes en el tiempo. Esto podría ayudar a definir temporalmente la participación del T6SS en la infección de macrófagos.

Al analizar los experimentos de expresión realizados en este trabajo, en que una pequeña población de los macrófagos infectados expresó los componentes del T6SS_{SPI-6} de *S. Typhimurium*, es importante tener en cuenta las experiencias pasadas en el estudio de componentes del T3SS en que también se observó la expresión en una pequeña población de las

bacterias que infectan macrófagos, al utilizar reporteros fluorescentes (Bumann *et al.*, 2002). Esto puede ser explicado en parte por las limitaciones del modelo celular utilizado, en el cual se simplifica drásticamente la interacción entre *Salmonella* y un organismo completo, además de alteraciones en la virulencia de *S. Typhimurium* debido a la producción heteróloga de proteínas fluorescentes potencialmente tóxicas, como GFPmut3 y mCherry (Knodler *et al.*, 2005; Clark *et al.*, 2009).

Las distintas rutas de ingreso de *Salmonella* para el desarrollo de una infección sistémica convergen en la utilización de células fagocíticas como vectores para alcanzar órganos internos (Watson *et al.*, 2010). Es por esto que para el análisis de la función del T6SS_{SPI-6} de *S. Typhimurium* se evaluó si la ausencia de alguno o todos los genes que codifican este sistema produce deficiencias en la capacidad de la bacteria para ingresar y sobrevivir al interior de macrófagos murinos y aviares. Para esto, se utilizó una cepa que carece del *cluster* completo que codifica el T6SS_{SPI-6} de *S. Typhimurium* (cepa MTM1317) y una mutante del gen ortólogo de *clpV* (gen *STM14_0319*) que carece de esta ATPasa necesaria para la actividad del sistema (cepa MTM1319) (Basler & Mekalanos *et al.*, 2012).

Contrariamente a lo planteado en la hipótesis de este trabajo, nuestros resultados indican que el T6SS_{SPI-6} de *S. Typhimurium* no incide en la capacidad de sobrevivir al interior de macrófagos murinos ni aviares, puesto que las mutantes que carecen del *cluster* completo del T6SS_{SPI-6}, o mutantes con una delección del gen *clpV*, sobrevivieron al mismo nivel que la cepa parental. Estos resultados se contraponen a los reportados recientemente por los grupos de Mulder *et al.* (2012) y Liu *et al.* (2012), quienes afirman que la eliminación del T6SS_{SPI-6} de *S. Typhimurium* incide en la supervivencia intracelular en macrófagos luego de 24 h de infección. Estas diferencias podrían explicarse por las distintas metodologías de los ensayos de internalización y supervivencia entre ambos trabajos y el utilizado en esta tesis. Por ejemplo, en el primero de ellos (Mulder *et al.*, 2012) los autores tratan las bacterias con suero humano para que éstas sean opsonizadas previo a la infección de células RAW264.7. Respecto al efecto de este tratamiento, está descrito que la opsonización afecta el mecanismo de internalización, lo cual altera la expresión de genes de virulencia de *Salmonella* producto de cambios en la maduración de la vacuola que contiene a *Salmonella* (SCV), como su acidificación (Drecktrah *et al.*, 2006). Para ejemplificar las diferencias que puede ocasionar esto, en un reporte del grupo de

Ochman *et al.* (1996) se determinó que el T3SS codificado en SPI-2 era necesario para la supervivencia en el interior de células fagocíticas, mediante el uso de una mutante del T3SS previamente opsonizada. Pocos meses después el grupo de Hensel *et al.* (1997) indicaba que la misma mutante, sin haber sido opsonizada, se replicaba normalmente en el interior de células fagocíticas respecto a la cepa parental. Por otra parte, en el trabajo de Liu *et al.* (2012), para observar diferencias en la supervivencia en macrófagos RAW264.7 se realizaron coinfecciones con la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y la mutante del T6SS_{SPI-6}. Es importante recordar que este ensayo corresponde a un modelo simplificado de la infección de componentes celulares del sistema inmune, por lo que el realizar coinfecciones en lugar de infecciones simples puede agregar más incertidumbre al problema inicial. Adicionalmente, en ninguno de los dos trabajos se realizan normalizaciones respecto a la cantidad efectiva de macrófagos al finalizar el ensayo, cosa que resulta relevante en el caso de *S. Typhimurium* que presenta una elevada citotoxicidad (Schwan *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1996). Todos estos detalles hacen cuestionarse si las pequeñas diferencias reportadas en las publicaciones antes mencionadas son producto directo de una contribución del T6SS_{SPI-6} en la supervivencia en macrófagos o son resultado de variables intrínsecas al experimento. Cualquiera que sea la explicación de las diferencias observadas, nuestros resultados ponen en duda la conclusión que el T6SS_{SPI-6} es requerido para la supervivencia de *S. Typhimurium* en el interior de macrófagos.

Es de interés destacar que los T6SS se han asociado a una gran variedad de fenotipos, de los cuales no todos se traducen en ventajas para la supervivencia intracelular en el contexto de una interacción patógeno-hospedero. Por ejemplo, en una publicación en que se analizó el T6SS de *Escherichia coli* patógena aviar (APEC) se determinó que éste no tenía incidencia en la supervivencia en el interior de macrófagos murinos. Sin embargo, mutantes que no contienen los genes *clpV* y *hcp* resultaron tener una menor adherencia y capacidad invasiva de células epiteliales (De Pace *et al.*, 2010). De manera similar, en un trabajo realizado con *Campylobacter jejuni* se determinó que en mutantes carentes del T6SS también había una reducción en la adherencia e internalización, tanto en las células epiteliales como en los macrófagos (Lertpiriyapong *et al.*, 2012). Un caso completamente distinto es el reportado para *Vibrio cholerae*, modelo en el cual se observó que mutantes carentes del gen *icmF* (componente estructural del T6SS) son más adherentes a monocapas de células epiteliales (Das *et al.*, 2002). Adicionalmente, en un trabajo realizado por el grupo de Ma *et al.* (2009) se describió que el

T6SS de *Vibrio cholerae* limita el ingreso de la bacteria a células fagocíticas gracias a la presencia de proteínas VgrG “evolucionadas”, las que contienen dominios entrecruzadores de actina en su extremo carboxilo terminal. Debido a esto, mutaciones en el sistema de secreción generan una mayor internalización de la bacteria respecto a la cepa silvestre en macrófagos murinos (Ma *et al.*, 2009). También han sido descritos casos en que el T6SS no está relacionado con virulencia, como el caso de *Helicobacter hepaticus*, donde mutantes de distintos componentes del T6SS ingresan a células epiteliales en mayor proporción que la cepa silvestre, colonizan mejor el intestino de ratones y, sin embargo, el T6SS promueve la expresión de citoquinas anti-inflamatorias (Chow *et al.*, 2010).

Si bien no se observó una contribución del T6SS_{SPI-6} de *S. Typhimurium* en supervivencia intracelular en macrófagos, sí se observó una significativa diferencia en la internalización. Nuestros resultados muestran que una mutante $\Delta clpV$ no polar (MTM1319) es internalizada en mayor proporción que la cepa parental, tanto en macrófagos murinos como aviares. Este fenotipo no fue revertido al complementar en *trans* el gen *STM14_0319*, sin embargo es necesario realizar pruebas con otros vectores de expresión para verificar este resultado. Curiosamente, con la mutante del *cluster* del T6SS_{SPI-6} completo (MTM1317) no se observaron diferencias en la internalización respecto a la cepa parental, como con la mutante $\Delta clpV$ (MTM1319). Esto podría deberse a que algunos de los genes dentro de la isla, a los cuales no se les ha asociado una función, pueden modular el efecto producido por los genes estudiados, neutralizando la acción producida en la célula hospedera. Por otra parte, puesto que los genes presentes en T6SS_{SPI-6} constituyen un organelo en la membrana, es probable que la ausencia de uno de los componentes afecte de forma más negativa el *fitness* de la bacteria al interactuar con macrófagos que la ausencia del organelo completo, debido al gasto energético que significaría para la bacteria ensamblar un sistema de secreción no funcional.

Es importante destacar que, a pesar de que la producción de los componentes del T6SS_{SPI-6} de *S. Typhimurium* ha sido demostrada en este trabajo y en trabajos anteriores (Mulder *et al.*, 2012), únicamente existe evidencia genética acerca de su funcionalidad puesto que la translocación del T6SS_{SPI-6} de *S. Typhimurium* al citosol de la célula eucarionte no ha sido reportada hasta la fecha. Para resolver esta interrogante, se analizó la translocación de la proteína VgrG al citoplasma de macrófagos infectados a través de un ensayo enzimático en el que se

detectó la hidrólisis del sustrato fluorogénico CCF2 o CCF4 por la acción de fusiones a la β -lactamasa TEM1, como se muestra en la Figura 21 (Zlokarnik *et al.*, 1998). Estos ensayos indicaron que la proteína VgrG fusionada a β -lactamasa TEM1 no es translocada al citoplasma macrófagos, indistintamente de su origen animal.

La discrepancia entre la producción de los componentes del T6SS_{SPI-6} de *S. Typhimurium* y la translocación del componente estructural analizado puede deberse tanto a razones fisiológicas como metodológicas. En primera instancia, puede que los componentes del T6SS_{SPI-6} de *S. Typhimurium* que se están expresando y traduciendo, requieran de alguna señal adicional otorgada por el contexto fisiológico de la infección para que el sistema se ensamble en la membrana de la bacteria y posteriormente pueda ejercer su actividad. Sin embargo, el hecho que en los ensayos de internalización al mutar el ortólogo del gen *clpV* se observe un fenotipo, indica que el T6SS_{SPI-6} de *S. Typhimurium* de alguna manera está participando en el modelo celular utilizado. Es por esto que se requiere analizar en detalle el ensayo de pérdida de FRET utilizado para el estudio de la funcionalidad del sistema.

Lo primero que debe ser considerado es una posible interferencia del dominio β -lactamasa TEM1 fusionado al extremo amino terminal de la proteína VgrG, debido a que ésta es la encargada de establecer contacto con la membrana del macrófago. A pesar de la existencia de reportes de T6SS que codifican proteínas VgrG con dominios funcionales adicionales en dicho extremo, tanto en *Salmonella* como en otras especies (Pukatzki *et al.*, 2009; Blondel *et al.*, 2009, Bröms *et al.*, 2012), es desconocido el impacto que puede significar esto para el T6SS_{SPI-6} de *S. Typhimurium*. Otro punto importante al momento de analizar los resultados obtenidos es la cantidad de proteínas secretadas, de acuerdo al rol que cumplen para los sistemas de secreción. La proteína VgrG corresponde a un componente estructural del T6SS, el cual formaría un trímero para ser translocado a la célula blanco (Pukatzki *et al.*, 2007; Basler *et al.*, 2012). La baja cantidad de enzima translocada, sumado a la escasa población de macrófagos en que se observó expresión del sistema, hacen que la probabilidad de observar eventos positivos sea muy baja. A diferencia de VgrG, la proteína SipA utilizada como control positivo de los experimentos corresponde a una molécula efectora del T3SS cuyos monómeros se unen a F-actina para el remodelamiento del citoesqueleto, la cual en estudios cinéticos se determinó que durante la infección se translocan $6 \pm 3 \cdot 10^3$ moléculas por célula (Schlumberger *et al.*, 2005). De acuerdo a

un análisis cuantitativo realizado por el grupo de trabajo de Zlokarnik *et al.* (1998), para una clara discriminación entre el sustrato CCF2 hidrolizado y sin hidrolizar en células que contienen entre 150 a 300 copias de β -lactamasa TEM1 se requieren cerca de 16 h de incubación, mientras que para una rápida conversión del sustrato (1 a 2 h, de acuerdo a lo indicado por el fabricante) se requieren sobre 10^3 moléculas por célula. Estos antecedentes hacen necesario realizar estudios futuros con metodologías más sensibles para confirmar los resultados obtenidos. Es por esto que, paralelamente al desarrollo de esta tesis, se construyó un plasmidio que permite la construcción de fusiones cromosomales al epítipo GSK-3 β (Hohlfeld *et al.*, 2006). Este epítipo corresponde a 13 residuos de una región fosforilable de la glicógeno sintasa kinasa 3 β (GSK-3 β) humana, el cual ha sido utilizado anteriormente para la detección de proteínas secretadas por los T3SS y T4SS (García *et al.*, 2006). Una de las principales ventajas de esta estrategia es que el epítipo GSK-3 β , además de ser significativamente más pequeño, es fosforilado eficientemente por kinasas citosólicas eucariontes, permitiendo el análisis de proteínas translocadas mediante el uso de anticuerpos fosfoespecíficos.

En resumen, los resultados de este trabajo indican que la expresión de los componentes del T6SS_{SPI-6} de *S. Typhimurium* es inducida al infectar macrófagos, independientemente de su origen animal, sin embargo esto no proporciona una ventaja para la supervivencia en su interior. Si bien no se observó la translocación del T6SS_{SPI-6} de *S. Typhimurium* al citosol de macrófagos, es necesario confirmar este resultado mediante una técnica de mayor sensibilidad. Por otra parte, las diferencias en la internalización observadas con una mutante no funcional del T6SS ($\Delta clpV::FRT$), junto con la observación de una expresión de los componentes del T6SS desde tiempos tempranos de infección, permiten plantear una posible participación del sistema en etapas tempranas de esta interacción. Considerando esto, sería interesante discernir en estudios posteriores si esta expresión es dependiente de la fagocitosis de *Salmonella* o basta el contacto de la bacteria con la célula fagocítica para que el sistema se exprese.

El gasto energético que significa para una bacteria la síntesis y ensamblaje de una maquinaria macromolecular de las dimensiones del T6SS hacen difícil pensar que este no tenga función alguna. Si bien no se observó una correspondencia entre la supervivencia de *S. Typhimurium* y la carencia del T6SS, existe una serie de respuestas del macrófago frente a la infección en las que podría estar participando el sistema y no estamos analizando. Por ejemplo,

macrófagos infectados pueden estar sufriendo cambios morfológicos que alteren procesos migratorios o la interacción con otros componentes celulares del sistema inmune. Recientemente se ha descrito que uno de los T6SS codificados en *Burkholderia cenocepacia* es causante del remodelamiento de filamentos de actina, interrumpiendo algunos procesos de tráfico vesicular y haciendo que colapsen estructuras como lamelopodios (Rosales-Reyes *et al.*, 2012). En *Salmonella enterica*, algunos artículos acerca del T3SS codificado en SPI-2 han destacado la participación de la proteína efectora SseI en procesos migratorios de macrófagos y células dendríticas infectadas, sin incidir en la capacidad de *Salmonella enterica* para sobrevivir en el interior de macrófagos. Esta alteración en la capacidad migratoria resulta ser fundamental para el desarrollo de una infección persistente y colonización de órganos internos (McLaughlin *et al.*, 2009). Otro proceso que sería interesante analizar es la secreción de citoquinas, puesto que en *Aeromonas hydrophila* se ha descrito que el T6SS inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias en ratones infectados, promoviendo la secreción de citoquinas inmunosupresoras como IL 10 y TGF β (Suarez *et al.*, 2010).

Por otra parte, es necesario recordar que nuestro modelo *in vitro* para el estudio de la interacción con macrófagos carece de la amplia diversidad celular con la que interactúa un macrófago en un contexto *in vivo*, la cual es de suma importancia durante la infección por un patógeno como *Salmonella*. Respecto a estos componentes celulares del sistema inmune que no corresponden a macrófagos, como neutrófilos del lumen intestinal, células dendríticas o linfocitos, se ha descrito que *S. Typhimurium* es capaz residir en su interior, lo que amplía considerablemente los posibles blancos del T6SS_{SPI-6} de *S. Typhimurium* (Loetscher *et al.*, 2012; Souwer *et al.*, 2012).

5. CONCLUSIONES

- La expresión y producción de los componentes estructurales del T6SS_{SPI-6} de *Salmonella* Typhimurium es gatillada solo cuando la bacteria interactúa con macrófagos murinos y aviares.
- Mediante el análisis de la hidrólisis de CCF2 no se detectó la translocación de VgrG al interior de macrófagos murinos y aviares, durante la infección.
- El T6SS_{SPI-6} de *Salmonella* Typhimurium no contribuye a la supervivencia en el interior de macrófagos murinos ni aviares.

6. BIBLIOGRAFÍA

Andersen JB, Sternberg C, Poulsen LK, Bjorn SP, Givskov M, Molin S. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1998. 64(6):2240-2246.

Aschtgen MS, Thomas MS, Cascales E. Anchoring the type VI secretion system to the peptidoglycan: TssL, TagL, TagP... what else? *Virulence.* 2010. 1(6):535-540.

Aubert DF, Flannagan RS, Valvano MA. A novel sensor kinase-response regulator hybrid controls biofilm formation and type VI secretion system activity in *Burkholderia cenocepacia*. *Infect Immun.* 2008. 76(5):1979-1991.

Basler M, Pilhofer M, Henderson GP, Jensen GJ, Mekalanos JJ. Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. *Nature.* 2012. 483(7388):182-186.

Basler M, Mekalanos JJ. Type 6 secretion dynamics within and between bacterial cells. *Science.* 2012. 337(6096):815.

Beug H, von Kirchbach A, Döderlein G, Conscience JF, Graf T. Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. *Cell.* 1979. 18(2):375-390.

Bingle LE, Bailey CM, Pallen MJ. Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr Opin Microbiol.* 2008. 11(1):3-8.

Blondel CJ, Jiménez JC, Contreras I, Santiviago CA. Comparative genomic analysis uncovers 3 novel loci encoding type six secretion systems differentially distributed in *Salmonella* serotypes. *BMC Genomics.* 2009. 10:354.

Blondel CJ, Yang HJ, Castro B, Chiang S, Toro CS, Zaldívar M, Contreras I, Andrews-Polymenis HL, Santiviago CA. Contribution of the type VI secretion system encoded in SPI-19 to chicken colonization by *Salmonella enterica* serotypes Gallinarum and Enteritidis. *PLoS One.* 2010. 5(7):e11724.

Bönemann G, Pietrosiuk A, Diemand A, Zentgraf H, Mogk A. Remodelling of VipA/VipB tubules by ClpV-mediated threading is crucial for type VI protein secretion. *EMBO J.* 2009. 28(4):315-325.

Boyer F, Fichant G, Berthod J, Vandenbrouck Y, Attree I. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics.* 2009. 10:104.

Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol.* 2000. 38(7):2465-2467.

- Bröms JE, Meyer L, Sun K, Lavander M, Sjöstedt A. Unique Substrates Secreted by the Type VI Secretion System of *Francisella tularensis* during Intramacrophage Infection. PLoS One. 2012. 7(11):e50473.
- Bumann D. Examination of Salmonella gene expression in an infected mammalian host using the green fluorescent protein and two-colour flow cytometry. Mol Microbiol. 2002. 43(5):1269-1283.
- Cascales, E. The type VI secretion toolkit. EMBO Rep. 2008. 9(8):735-741.
- CDC. Salmonella Surveillance: Annual Summary, 2006. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2008.
- Chappell L, Kaiser P, Barrow P, Jones MA, Johnston C, Wigley P. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. Vet Immunol Immunopathol. 2009. 128(1-3):53-59.
- Chen LM, Kaniga K, Galán JE. Salmonella spp. are cytotoxic for cultured macrophages. Mol Microbiol. 1996. 21(5):1101-1115.
- Chow J, Mazmanian SK. A pathobiont of the microbiota balances host colonization and intestinal inflammation. Cell Host Microbe. 2010. 7(4):265-276.
- Clark L, Martinez-Argudo I, Humphrey TJ, Jepson MA. GFP plasmid-induced defects in Salmonella invasion depend on plasmid architecture, not protein expression. Microbiology. 2009. 155(Pt 2):461-467.
- Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). Gene. 1996. 173(1 Spec No):33-38.
- Das S, Chakraborty A, Banerjee R, Chaudhuri K. Involvement of *in vivo* induced *icmF* gene of *Vibrio cholerae* in motility, adherence to epithelial cells, and conjugation frequency. Biochem Biophys Res Commun. 2002. 295(4):922-928.
- Das S, Chaudhuri K. Identification of a unique IAHP (IcmF associated homologous proteins) cluster in *Vibrio cholerae* and other proteobacteria through *in silico* analysis. In Silico Biol. 2003. 3(3):287-300.
- Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000. 97(12):6640-6645.
- Desvaux M, Parham NJ, Scott-Tucker A, Henderson IR. The general secretory pathway: a general misnomer? Trends Microbiol. 2004. 12(7):306-309.
- De Pace F, Nakazato G, Pacheco A, de Paiva JB, Sperandio V, da Silveira WD. The type VI secretion system plays a role in type 1 fimbria expression and pathogenesis of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. Infect Immun. 2010. 78(12):4990-4998.

Di Virgilio F, Steinberg TH, Swanson JA, Silverstein SC. Fura-2 secretion and sequestration in macrophages. A blocker of organic anion transport reveals that these processes occur via a membrane transport system for organic anions. *J Immunol.* 1988. 140(3):915-920.

Drecktrah D, Knodler LA, Ireland R, Steele-Mortimer O. The mechanism of *Salmonella* entry determines the vacuolar environment and intracellular gene expression. *Traffic.* 2006. 7(1):39-51.

Folkesson A, Löfdahl S, Normark S. The *Salmonella enterica* subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel protein families present in bacteria living in close contact with eukaryotic cells. *Res Microbiol.* 2002. 153(8):537-545.

Galán JE. Interaction of *Salmonella* with host cells through the centisome 63 type III secretion system. *Curr Opin Microbiol.* 1999. 2(1):46-50.

Galán JE. Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol Microbiol.* 1996. 20(2):263-271.

Garcia JT, Ferracci F, Jackson MW, Joseph SS, Pattis I, Plano LR, Fischer W, Plano GV. Measurement of effector protein injection by type III and type IV secretion systems by using a 13-residue phosphorylatable glycogen synthase kinase tag. *Infect Immun.* 2006. 74(10):5645-5657.

Gerlach RG, Hölzer SU, Jäckel D, Hensel M. Rapid engineering of bacterial reporter gene fusions by using Red recombination. *Appl Environ Microbiol.* 2007. 73(13):4234-42.

Groisman EA, Ochman H. How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol.* 1997. 5(9):343-349.

Groisman EA, Ochman H. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell.* 1996. 87(5):791-794.

Gruenheid S, Finlay BB. Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature.* 2003. 422(6933):775-781.

Hallstrom K, McCormick BA. *Salmonella* Interaction with and Passage through the Intestinal Mucosa: Through the Lens of the Organism. *Front Microbiol.* 2011. 2:88.

Haraga A, Ohlson MB, Miller SI. *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol.* 2008. 6(1):53-66.

Hensel M, Shea JE, Raupach B, Monack D, Falkow S, Gleeson C, Kubo T, Holden DW. Functional analysis of *ssaJ* and the *ssaK/U* operon, 13 genes encoding components of the type III secretion apparatus of *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *Mol Microbiol.* 1997. 24(1):155-167.

- Hensel M. *Salmonella* pathogenicity island 2. Mol Microbiol. 2000. 36(5):1015-1023.
- Hohlfeld S, Pattis I, Püls J, Plano GV, Haas R, Fischer W. A C-terminal translocation signal is necessary, but not sufficient for type IV secretion of the *Helicobacter pylori* CagA protein. Mol Microbiol. 2006. 59(5):1624-1637.
- Klumpp J, Fuchs TM. Identification of novel genes in genomic islands that contribute to *Salmonella typhimurium* replication in macrophages. Microbiology. 2007. 153(Pt 4):1207-1220.
- Knodler LA, Bestor A, Ma C, Hansen-Wester I, Hensel M, Vallance BA, Steele-Mortimer O. Cloning vectors and fluorescent proteins can significantly inhibit *Salmonella enterica* virulence in both epithelial cells and macrophages: implications for bacterial pathogenesis studies. Infect Immun. 2005. 73(10):7027-7031.
- Leiman PG, Basler M, Ramagopal UA, Bonanno JB, Sauder JM, Pukatzki S, Burley SK, Almo SC, Mekalanos JJ. Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009. 106(11):4154-4159.
- Lertpiriyapong K, Gamazon ER, Feng Y, Park DS, Pang J, Botka G, Graffam ME, Ge Z, Fox JG. *Campylobacter jejuni* type VI secretion system: roles in adaptation to deoxycholic acid, host cell adherence, invasion, and in vivo colonization. PLoS One. 2012. 7(8):e42842.
- Libby SJ, Brehm MA, Greiner DL, Shultz LD, McClelland M, Smith KD, Cookson BT, Karlinsey JE, Kinkel TL, Porwollik S, Canals R, Cummings LA, Fang FC. Humanized nonobese diabetic-scid IL2 γ ^{null} mice are susceptible to lethal *Salmonella* Typhi infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010. 107(35):15589-15594.
- Liu J, Guo JT, Li YG, Johnston RN, Liu GR, Liu SL. The type VI secretion system gene cluster of *Salmonella typhimurium*: required for full virulence in mice. J Basic Microbiol. 2012. doi: 10.1002/jobm.201200047. [Epub ahead of print]
- Loetscher Y, Wieser A, Lengefeld J, Kaiser P, Schubert S, Heikenwalder M, Hardt WD, Stecher B. *Salmonella* transiently reside in luminal neutrophils in the inflamed gut. PLoS One. 2012. 7(4):e34812.
- Ly KT, Casanova JE. Mechanisms of *Salmonella* entry into host cells. Cell Microbiol. 2007. 9(9):2103-21011.
- MacIntyre DL, Miyata ST, Kitaoka M, Pukatzki S. The *Vibrio cholerae* type VI secretion system displays antimicrobial properties. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010. 107(45):19520-19524.
- Malo D, Vogan K, Vidal S, Hu J, Cellier M, Schurr E, Fuks A, Bumstead N, Morgan K, Gros P. Haplotype mapping and sequence analysis of the mouse Nramp gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites. Genomics. 1994. 23(1):51-61.
- Maloy S, Stewart V, Taylor R. Genetic analysis of pathogenic bacteria: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory; 1996.

- Ma AT, McAuley S, Pukatzki S, Mekalanos JJ. Translocation of a *Vibrio cholerae* type VI secretion effector requires bacterial endocytosis by host cells. *Cell Host Microbe*. 2009. 5(3):234-243.
- McLaughlin LM, Govoni GR, Gerke C, Gopinath S, Peng K, Laidlaw G, Chien YH, Jeong HW, Li Z, Brown MD, Sacks DB, Monack D. The Salmonella SPI2 effector SseI mediates long-term systemic infection by modulating host cell migration. *PLoS Pathog*. 2009. 5(11):e1000671.
- Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*. 1999. 5(5):607-625.
- Mizusaki H, Takaya A, Yamamoto T, Aizawa S. Signal pathway in salt-activated expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol*. 2008. 190(13):4624-4631.
- Mougous JD, Cuff ME, Raunser S, Shen A, Zhou M, Gifford CA, Goodman AL, Joachimiak G, Ordoñez CL, Lory S, Walz T, Joachimiak A, Mekalanos JJ. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science*. 2006. 312(5779):1526-1530.
- Mulder DT, Cooper CA, Coombes BK. Type VI secretion system-associated gene clusters contribute to pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun*. 2012. 80(6):1996-2007.
- Ochman H, Soncini FC, Solomon F, Groisman EA. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996. 93(15):7800-7804.
- Parsons DA, Heffron F. *sciS*, an *icmF* homolog in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, limits intracellular replication and decreases virulence. *Infect Immun*. 2005. 73(7):4338-4345.
- Pell LG, Kanelis V, Donaldson LW, Howell PL, Davidson AR. The phage lambda major tail protein structure reveals a common evolution for long-tailed phages and the type VI bacterial secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009. 106(11):4160-4165.
- Pukatzki S, Ma AT, Revel AT, Sturtevant D, Mekalanos JJ. Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007. 104(39):15508-15513.
- Pukatzki S, Ma AT, Sturtevant D, Krastins B, Sarracino D, Nelson WC, Heidelberg JF, Mekalanos JJ. 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):1528-1533.
- Pukatzki S, McAuley SB, Miyata ST. The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Curr Opin Microbiol*. 2009. 12(1):11-17.
- Rabsch W, Andrews HL, Kingsley RA, Prager R, Tschäpe H, Adams LG, Bäumlér AJ. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. *Infect Immun*. 2002. 70(5):2249-2255.

Raffatellu M, Sun YH, Wilson RP, Tran QT, Chessa D, Andrews-Polymenis HL, Lawhon SD, Figueiredo JF, Tsolis RM, Adams LG, Bäumlér AJ. Host restriction of *Salmonella enterica* serotype Typhi is not caused by functional alteration of SipA, SopB, or SopD. *Infect Immun.* 2005. 73(12):7817-7826.

Records AR. The type VI secretion system: a multipurpose delivery system with a phage-like machinery. *Mol Plant Microbe Interact.* 2011. 24(7):751-757.

Rosales-Reyes R, Skeldon AM, Aubert DF, Valvano MA. The Type VI secretion system of *Burkholderia cenocepacia* affects multiple Rho family GTPases disrupting the actin cytoskeleton and the assembly of NADPH oxidase complex in macrophages. *Cell Microbiol.* 2012. 14(2):255-273.

Russell AB, Hood RD, Bui NK, LeRoux M, Vollmer W, Mougous JD. Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature.* 2011. 475(7356):343-347.

Ryan K, Ray CG, Ahmad N, Drew WL, Plorde J. Sherris. *Medical Microbiology, Fifth Edition.* 2010.

Santiviago CA, Reynolds MM, Porwollik S, Choi SH, Long F, Andrews-Polymenis HL, McClelland M. Analysis of pools of targeted *Salmonella* deletion mutants identifies novel genes affecting fitness during competitive infection in mice. *PLoS Pathog.* 2009. 5(7):e1000477.

Santos RL, Raffatellu M, Bevins CL, Adams LG, Tükel C, Tsolis RM, Bäumlér AJ. Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style. *Trends Microbiol.* 2009. 17(11):498-506.

Schlieker C, Zentgraf H, Dersch P, Mogk A. ClpV, a unique Hsp100/Clp member of pathogenic proteobacteria. *Biol Chem.* 2005. 386(11):1115-1127.

Schlumberger MC, Müller AJ, Ehrbar K, Winnen B, Duss I, Stecher B, Hardt WD. Real-time imaging of type III secretion: *Salmonella* SipA injection into host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005. 102(35):12548-12553.

Schwan WR, Huang XZ, Hu L, Kopecko DJ. Differential bacterial survival, replication, and apoptosis-inducing ability of *Salmonella* serovars within human and murine macrophages. *Infect Immun.* 2000. 68(3):1005-1013.

Sexton JA, Miller JL, Yoneda A, Kehl-Fie TE, Vogel JP. *Legionella pneumophila* DotU and IcmF are required for stability of the Dot/Icm complex. *Infect Immun.* 2004. 72(10):5983-5992.

Sivula CP, Bogomolnaya LM, Andrews-Polymenis HL. A comparison of cecal colonization of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in white leghorn chicks and *Salmonella*-resistant mice. *BMC Microbiol.* 2008. 8:182.

- Souwer Y, Griekspoor A, de Wit J, Martinoli C, Zagato E, Janssen H, Jorritsma T, Bar-Ephraïm YE, Rescigno M, Neeffes J, van Ham SM.* Selective infection of antigen-specific B lymphocytes by *Salmonella* mediates bacterial survival and systemic spreading of infection. *PLoS One*. 2012. 7(11):e50667.
- Stocker BA, Hoiseth SK, Smith BP.* Aromatic-dependent "*Salmonella* sp." as live vaccine in mice and calves. *Dev Biol Stand*. 1983. 53:47-54.
- Suarez G, Sierra JC, Kirtley ML, Chopra AK.* Role of Hcp, a type 6 secretion system effector, of *Aeromonas hydrophila* in modulating activation of host immune cells. *Microbiology*. 2010. 156(Pt 12):3678-3688.
- Tam MA, Rydström A, Sundquist M, Wick MJ.* Early cellular responses to *Salmonella* infection: dendritic cells, monocytes, and more. *Immunol Rev*. 2008. 225:140-162.
- Tseng TT, Tyler BM, Setubal JC.* Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol*. 2009. 9 Suppl 1:S2.
- Tsolis RM, Young GM, Solnick JV, Bäumlér AJ.* From bench to bedside: stealth of enteroinvasive pathogens. *Nat Rev Microbiol*. 2008. 6(12):883-892.
- Vieira, AR, et al.* WHO Global Foodborne Infections Network Country Databank – A resource to link human and non-human sources of *Salmonella*. 2009. ISVEE Conference, Durban, South Africa.
- Wang RF, Kushner SR.* Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene*. 1991. 100:195-199.
- Wang M, Luo Z, Du H, Xu S, Ni B, Zhang H, Sheng X, Xu H, Huang X.* Molecular characterization of a functional type VI secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Curr Microbiol*. 2011. 63(1):22-31.
- Watson KG, Holden DW.* Dynamics of growth and dissemination of *Salmonella* in vivo. *Cell Microbiol*. 2010. 12(10):1389-1397.
- Williams SG, Varcoe LT, Attridge SR, Manning PA.* *Vibrio cholerae* Hcp, a secreted protein coregulated with HlyA. *Infect Immun*. 1996. 64(1):283-289.
- Winter SE, Thiennimitr P, Winter MG, Butler BP, Huseby DL, Crawford RW, Russell JM, Bevins CL, Adams LG, Tsolis RM, Roth JR, Bäumlér AJ.* Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature*. 2010. 467(7314):426-429.
- Wooldridge K.* Bacterial Secreted Proteins: Secretory Mechanisms and Role in Pathogenesis. 2009.
- Zlokarnik G, Negulescu PA, Knapp TE, Mere L, Burren N, Feng L, Whitney M, Roemer K, Tsién RY.* Quantitation of transcription and clonal selection of single living cells with beta-lactamase as reporter. *Science*. 1998. 279(5347):84-88.