

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**“Participación de los Sistemas de Secreción Tipo VI
codificados en el genoma de *Salmonella enterica* serovar
Dublin en la interacción con macrófagos murinos”**

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

BERNARDO ISMAEL PINTO ANWANDTER

DIRECTORES DE TESIS

Dra. Lucía Inés Contreras Osorio

Dr. Carlos Santiviago Cid

Santiago-CHILE

OCTUBRE 2012

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

BERNARDO ISMAEL PINTO ANWANDTER

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 y Biotecnología 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. Maria Antonieta Valenzuela _____

Dr. Dante Miranda Wilson _____

Dr. Roberto Vidal Alvarez _____

AGRADECIMIENTOS

Lo primero que quisiera agradecer a todos es su apoyo. Sin el apoyo de ustedes esta tesis nunca hubiera llegado a ser lo que es. Sin el apoyo de mi familia, amigos y profesores nunca hubiera podido lograr completar esta carrera que de hoy en adelante se convertirá en mi profesión.

Quisiera comenzar agradeciendo a mis padres, los cuales no sólo me brindaron educación escolar y universitaria, sino que completaron la tarea que nadie más podía llevar a cabo, la de formarme para convertirme en la persona que soy. Ellos me enseñaron a relacionarme con los demás, a decir gracias y por favor y a disfrutar la vida. Siempre recuerdo con mucho cariño las discusiones en la mesa de mi papá sobre temas como religión, política, filosofía y ciencia. Estas discusiones me enseñaron a argumentar mis ideas y entender los puntos de vista de los demás. A mi mamá, mi gran confidente, le agradezco ese amor incondicional que las madres saben dar, su apoyo y preocupación en los tiempos difíciles me ayudaron mucho, gracias por siempre tener una palabra para alegrarme. También gracias mis hermanos Mema, Lore, Nacho y Ja por los momentos que pasamos juntos, almuerzos, cumpleaños, viajes, risas y peleas.

A mi directora "la Dop" por acogerme en su laboratorio, en donde aprendí como se hace investigación, por su paciencia en enseñarme y corregirme cuando cometí algún error. Gracias también por el gran ambiente que tenemos en el laboratorio, en los seminarios, celebraciones de navidad y fin de año nunca han faltado las risas ni el buen humor.

Al "Cliff", mi co-director por su ánimo incansable y su buena disposición siempre. Por esa capacidad de siempre reír y echar la talla después de un día cansador.

A Quintremil, Feña y Pablo, los tres mosqueteros que han estado conmigo en las buenas y en las malas, les agradezco la amistad que hemos formado en estos años de carrera. El tenerlos a ustedes para compartir las dificultades y alegrías ha sido un gran soporte.

A Marianne, Grillo, Pablo, Damian y Vale por estos 7 años de los cuales tengo muy buenos recuerdos, como los paseos a Cartagua de principio de año, los carretes en mi casa y los paseos a San Felipe y Quintay.

A mis compañeros y amigos del lab, Sergio, Lorenzo, David, Carlos, Paula, Camila y Roberto, sin olvidarnos de los chechenos Grillo, Cracra, Pipe y Pía, con quienes compartí

tanto dentro como fuera del laboratorio. Gracias por hacer del lab un lugar entretenido y también por la amistad fuera de él.

A mis amigos de la ANIP y Más Ciencia Para Chile, con quienes descubrí que la ciencia no sólo se hace en el laboratorio. En estas dos organizaciones aprendí que es importante no dejar de lado el rol social de la ciencia y que los científicos también podemos aportar a la construcción de nuestro país.

Quisiera dedicar este último párrafo a mi tata Jorge, el cual nos dejó hace poco. Él fue un ejemplo para todos los que lo conocimos, nos enseñó poco con palabras y mucho con sus acciones. Su gran orgullo fue su familia y la disfrutó hasta el último día. Siempre recordare sus anécdotas, su buen humor, su cariño y su integridad. Y como dice mi mamá “Días de sol, no llores porque se fueron, sonríte porque estuvieron”.

Esta Tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT 1100092

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	III
ABREVIATURAS	V
RESUMEN	VIII
SUMMARY	X
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.1. Reactivos	11
2.2 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	12
2.3 Plasmidios	13
2.4 Partidores	14
2.5 Generación de mutantes en genes de los Sistemas de Secreción Tipo VI codificados en las islas de patogenicidad SPI-6 y SPI-19	15
2.5.1 Obtención de los productos de PCR	15
2.5.2 Mutagénesis	15
2.5.3 Comprobación de la mutagénesis	16
2.5.4 Electroforesis en geles de agarosa	16
2.5.5 Generación de lisados del fago P22 y transducción generalizada	17
2.5.6 Eliminación del <i>cassette</i> de resistencia a antibiótico	17
2.6 Construcciones de fusiones VgrG-GFP	18
2.6.1 Obtención de los productos de PCR	18
2.6.2 Mutagénesis	19
2.6.3 Comprobación de la mutagénesis	19
2.7 Generación del vector pVgrGFT para ensayos de translocación	19
2.7.1 Clonamiento del marco de lectura de <i>vgrG</i> en el vector pFlagTEM	19
2.7.2 Preparación de muestras de proteínas	20
2.7.3 Electroforesis SDS-PAGE	20
2.7.4 Transferencia a membranas de PVDF y bloqueo	21
2.7.5 Inmunodetección por quimioluminiscencia	21
2.8 Ensayos de infección <i>in vitro</i>	22

2.8.1 Condiciones de cultivo celular	22
2.8.2 Ensayos de internalización y supervivencia intracelular de cepas de <i>S. Dublin</i> en macrófagos murinos RAW 264.7	22
2.8.3 Análisis estadístico	23
2.9 Ensayos de expresión y translocación del componente VgrG al interior de macrófagos RAW26.7	24
2.9.1 Ensayo de expresión intracelular	24
2.9.2 Ensayo de translocación citoplasmática.....	24
3. RESULTADOS	26
3.1. Los T6SS codificados en las islas genómicas SPI-6 y SPI-19 de <i>S. Dublin</i> se expresan al interior de macrófagos murinos.....	26
3.1.1. Construcción de fusiones traduccionales y transcripcionales de <i>vgrG</i> al reportero GFP.....	26
3.1.2 Los T6SS codificados en SPI-6 y SPI-19 de <i>S. Dublin</i> se expresan al interior de macrófagos murinos	28
3.2 Analisis de translocación citoplasmática de VgrG.....	32
3.2.1 Construcción de la fusión de VgrG al reportero TEM-1 para el análisis de translocación de VgrG	32
3.2.2 Análisis de la funcionalidad de los T6SS codificados en <i>S. Dublin</i> en macrófagos murinos mediante microscopía de fluorescencia	36
3.3 Los T6SS codificados en el genoma de <i>S. Dublin</i> no son necesarios para el ingreso o supervivencia de la bacteria al interior de macrófagos	39
3.3.1 Generación de mutantes.....	39
3.3.2 Las mutantes carentes de los T6SS no presentan deficiencias de internalización y supervivencia intracelular en macrófagos	41
4. DISCUSIÓN	44
5. CONCLUSIONES	49
6. BIBLIOGRAFÍA	50

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en la presente Tesis.....	13
Tabla 2. Plasmidios utilizados en la presente Tesis.....	14
Tabla 3. Partidores utilizados en la presente Tesis.....	14
Figura 1. Representación esquemática del ciclo infectivo de <i>Salmonella</i>	2
Figura 2. Representación esquemática de los seis sistemas de secreción presentes en bacterias Gram negativo.....	4
Figura 3. Modelo del T6SS y su similitud al bacteriófago T4.....	7
Figura 4. Esquema de la generación de fusiones transcripcionales y traduccionales a un gen reportero.....	27
Figura 5. Comprobación de la correcta construcción de fusiones transcripcionales y traduccionales a GFP del gen <i>vgrG</i> codificado en SPI-6.....	28
Figura 6. Análisis de la expresión de las fusiones traduccionales y transcripcionales de <i>vgrG</i> al gen reportero <i>gfp</i> en medio DMEM.....	29
Figura 7. Expresión de las fusiones traduccionales y transcripcionales de <i>vgrG</i> al reportero <i>gfp</i> 1 hora post-infección de macrófagos murinos.....	30
Figura 8. Expresión de las fusiones traduccionales y transcripcionales de <i>vgrG</i> al reportero <i>gfp</i> 21 horas post-infección de macrófagos murinos.....	31
Figura 9. Esquema del ensayo de translocación de la proteína VgrG al citoplasma de macrófagos RAW 264.7.....	33
Figura 10. Esquema de la generación del vector pVgrGFT _{SPI-6}	34
Figura 11. Confirmación del clonamiento de <i>vgrG</i> en vector pFlagTEM.....	35

Figura 12. Análisis de translocación de VgrG a 1 h post-infección.....	37
Figura 13. Análisis de translocación a 21 h post-infección.....	39
Figura 14. Generación de mutantes mediante reemplazo alélico por recombinación de un producto de PCR.....	41
Figura 15. Internalización y supervivencia intracelular de mutantes en los T6SS codificados en las islas SPI-6 y SPI-19 de <i>S. Dublin</i>	42
Figura 16. Internalización y supervivencia intracelular de mutantes en el gen <i>clpV</i> de los T6SS codificados en las islas SPI-6 y SPI-19 de <i>S. Dublin</i>	43

ABREVIATURAS

Amp:	Ampicilina
ATP:	Adenosín trifosfato
Cam:	Cloranfenicol
ClpV _{SPI-19} :	ClpV del T6SS codificado en SPI-19
ClpV _{SPI-6} :	ClpV del T6SS codificado en SPI-6
DMEM:	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DNA:	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP:	Desoxirribonucleótido trifosfato
EBU:	<i>Evans blue-Uranine</i>
EDTA:	Ácido Etilendiamintetraacético
FRT:	<i>Flp Recombinase Target Sequence</i>
GFP:	<i>Green Fluorescent Protein</i>
Glu:	Glucosa
IPTG:	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
Kan:	Kanamicina
LB:	Luria-Bertani
MOI:	Multiplicidad de infección
nt:	Nucleótidos
ORF:	Marco de lectura abierto
pb:	Pares de bases

PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PSA:	Persulfato de amonio
PVDF:	Polifluoruro de vinilideno
RCF:	Fuerza centrífuga relativa
RNA:	Ácido ribonucleico
SDS:	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE:	Electroforesis en gel desnaturante de poliacrilamida
SFB:	Suero fetal bovino
SPI-1:	Isla de patogenicidad 1 de <i>Salmonella</i>
SPI-2:	Isla de patogenicidad 2 de <i>Salmonella</i>
SPI-4:	Isla de patogenicidad 4 de <i>Salmonella</i>
SPI-6:	Isla de patogenicidad 6 de <i>Salmonella</i>
SPI-19:	Isla de patogenicidad 19 de <i>Salmonella</i>
T3SS:	Sistema de Secreción Tipo III
T6SS:	Sistema de Secreción Tipo VI
TAE:	Tris-Acetato-EDTA
td:	Traduccional
TEMED:	Tetrametiletilenediamina
Tm:	Trimetoprim
tRNA:	RNA de transferencia
ts:	Transcripcional
UV:	Ultra Violeta

V: Volts

$V_{grG_{SPI-19}}$: VgrG del T6SS codificado en SPI-19

$V_{grG_{SPI-6}}$: VgrG del T6SS codificado en SPI-6

RESUMEN

El género *Salmonella* agrupa a más de 2500 serovares, muchos de los cuales son patógenos humanos y animales. El serovar Dublin afecta principalmente al ganado bovino pudiendo llegar a infectar a seres humanos por el consumo de alimentos contaminados.

Salmonella presenta diversos mecanismos que le permiten ingresar y colonizar sistémicamente a sus hospederos. Algunos de estos mecanismos se relacionan con la capacidad de invadir el epitelio intestinal y sobrevivir al interior de las células del sistema inmune del hospedero, principalmente macrófagos. En ambos procesos los sistemas de secreción de proteínas juegan un papel fundamental.

El Sistema de Secreción Tipo VI (T6SS) es el sistema de secreción más recientemente descrito en bacterias Gram negativo. Este sistema se encuentra codificado en el genoma de cerca del 25% de las bacterias secuenciadas y su importancia en las relaciones interbacterianas y en la relación bacteria-hospedero lo han convertido en un blanco de estudio de gran interés. Previamente, hemos identificado la presencia de 5 T6SS filogenéticamente distintos y distribuidos diferencialmente en representantes del género *Salmonella*. *S. Dublin* posee dos T6SS codificados en las islas de patogenicidad SPI-6 y SPI-19.

El objetivo de este proyecto fue determinar si los T6SS codificados en SPI-6 y SPI-19 se expresan al interior de macrófagos murinos y si cumplen un papel en los procesos de invasión y supervivencia intracelular de *S. Dublin* en estas células. Para esto, se evaluó la expresión intracelular y translocación de un componente fundamental del sistema (VgrG) y se compararon mutantes de los T6SS de SPI-6 y SPI-19 respecto a la cepa silvestre en su capacidad de invadir y sobrevivir en macrófagos murinos en cultivo *in vitro*.

Para evaluar la expresión del gen *vgrG* y de la proteína VgrG codificada en cada uno de los T6SS presentes en el genoma de *S. Dublin* al interior de macrófagos, se construyeron en el cromosoma de la bacteria fusiones transcripcionales y traduccionales a la proteína fluorescente verde y se infectaron macrófagos RAW 264.7 con las cepas que contenían estas fusiones. Mediante microscopía de epifluorescencia se observó la expresión de las

fusiones transcripcionales y traduccionales del componente VgrG de ambos T6SS desde tiempos tempranos de infección.

Para determinar la translocación de VgrG al citoplasma de macrófagos infectados *in vitro*, se utilizaron fusiones traduccionales de VgrG_{SPI-6} y VgrG_{SPI-19} al reportero TEM-1 construidas en el plasmidio pFlagTEM. La translocación de cada proteína de fusión se determinó mediante un ensayo de fluorescencia acoplado a FRET. Para ello, se infectaron macrófagos RAW 264.7 con las cepas que contenían estas fusiones y posteriormente se analizaron los macrófagos infectados mediante microscopía de epifluorescencia. Se observó la translocación de VgrG_{SPI-19} a tiempos tempranos de infección y la translocación de VgrG_{SPI-6} a tiempos tardíos de infección. Sin embargo, la baja frecuencia de los eventos de translocación observados hace necesario realizar la comprobación del fenómeno mediante metodologías más sensibles.

Para determinar si los T6SS codificados en el genoma de *S. Dublin* participan en los procesos de internalización y supervivencia de la bacteria al interior de macrófagos murinos, se realizaron ensayos de protección a gentamicina. En ellos se comparó la capacidad de ingresar y sobrevivir al interior de macrófagos RAW 264.7 de la cepa silvestre y cepas mutantes de los T6SS o del componente ClpV. Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que ninguno de los T6SS contribuye a la invasión y supervivencia intracelular de *S. Dublin* en macrófagos murinos.

En conclusión, los T6SS codificados en las islas de patogenicidad SPI-6 y SPI-19 de *S. Dublin* se expresan al interior de macrófagos murinos, pero no participan en la capacidad de la bacteria para invadir y sobrevivir al interior de éstos.

SUMMARY

The *Salmonella* genus includes over 2500 serovars, many of which are human and animal pathogens. Although the serovar Dublin affects mainly livestock, it constitutes a threat to humans who consume contaminated foods.

Salmonella has several mechanisms to colonize its hosts systemically. These mechanisms allow it to invade the intestinal epithelium and survive within immune cells, mainly macrophages. Of note, protein secretion systems play a central role in these processes.

The Type VI Secretion System (T6SS) is the most recently described protein secretion system in Gram-negative bacteria. This secretion system is present in about 25% of all bacterial genomes and its putative role in inter-bacteria and bacteria-host relationships makes it an important target for scientific research. Previously we have identified the presence of 5 phylogenetically diverse T6SS distributed differentially in the *Salmonella* genus. *S. Dublin* carries two of these systems codified in the pathogenicity islands SPI-6 and SPI-19.

The aim of this thesis was to determine if the T6SSs codified in SPI-6 and SPI-19 are expressed in and translocated to the cytosol of murine macrophages, and if they play a role in the internalization and survival of *S. Dublin* inside these cells. To achieve this, intracellular expression and translocation of a core component of T6SSs (VgrG) was analyzed and T6SS mutants were compared with the parental strain in their ability to invade and survive within murine macrophages *in vitro*.

To assess the expression of the *vgrG* gene and VgrG protein codified in each *S. Dublin* T6SS within murine macrophages, transcriptional and translational fusions to the green fluorescent protein were constructed and macrophages RAW 264.7 were infected using the strains bearing these fusions. Using epifluorescence microscopy, expression was observed for the transcriptional and translational fusions of the VgrG component of both T6SSs.

To determine the translocation of VgrG to the cytosol of infected macrophages *in vitro*, translational fusions of VgrG_{SPI-6} and VgrG_{SPI-19} to the TEM-1 reporter were constructed in plasmid pFlagTEM. Translocation of each protein was determined using a FRET-coupled fluorescence assay. To achieve this, RAW 264.7 macrophages were infected using strains bearing these fusions and subsequent analysis of the infected macrophages was carried out by epifluorescence microscopy. VgrG_{SPI-19} translocation was observed shortly after infection and VgrG_{SPI-6} translocation was observed several hours after infection. Noteworthy, due to the low frequency of the translocation events observed it is necessary to confirm this observation by means of more sensitive methods.

To determine if the T6SSs codified in the *S. Dublin* genome play a role in the internalization and survival processes of the bacteria within murine macrophages, gentamicin protection assays were conducted. In these experiments, the ability to enter and survive in RAW 264.7 macrophages *in vitro* was compared between T6SS and ClpV mutant strains and the parental strain. The results of this work show that none of the T6SSs contribute to the ability of *S. Dublin* to invade and survive in murine macrophages.

In conclusion, the T6SS encoded in pathogenicity islands SPI-6 and SPI-19 of *S. Dublin* are expressed in murine macrophages, but these do not play a role in the invasion or intracellular survival of the bacteria in these cells.

1. INTRODUCCIÓN

Salmonella es un microorganismo patógeno de gran importancia sanitaria a nivel global. El género comprende a las especies *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, que en conjunto agrupan a más de 2.500 serovares. *Salmonella enterica* se divide en siete subespecies, de las cuales la subespecie *enterica* es la principal causante de enfermedades en humanos y otros animales de sangre caliente [1].

Dependiendo de las características del serovar y del hospedero infectado, *Salmonella enterica* es capaz de producir distintos cuadros patológicos. Por ejemplo *Salmonella enterica* serovar Typhi en el ser humano causa la fiebre tifoidea, una enfermedad sistémica caracterizada por bacteremia, fiebre, inflamación del hígado y bazo, y en algunos casos perforación intestinal y hemorragia. Sin embargo, *S. Typhi* no causa enfermedad en otros animales. Por otra parte, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium produce en humanos una gastroenteritis autolimitada caracterizada por diarrea, dolor abdominal, náuseas, vómito y fiebre, mientras que en el ratón produce una enfermedad sistémica similar a la fiebre tifoidea [2]. Se estima que los casos a nivel mundial de gastroenteritis por *Salmonella* ascienden a los 93.757.000, de los cuales 155.000 tienen consecuencias fatales [3].

En el caso del ganado bovino, éste desarrolla comúnmente gastroenteritis debido a *S. Typhimurium* y a *Salmonella enterica* serovar Dublin [4]. A diferencia de *S. Typhimurium*, que es un serovar de amplio rango de hospedero, *S. Dublin* se caracteriza por ser un serovar de rango restringido además de ser capaz de mantenerse indefinidamente en el hospedero bovino y encontrarse frecuentemente asociado a complicaciones respiratorias y aborto [1, 4]. En Estados Unidos, *S. Dublin* corresponde al quinto serovar más común en aislados clínicos no humanos, siendo su mayor presencia en ganado bovino. Pese a no ser un serovar que se asocie comúnmente a patologías en humanos, es capaz de provocar enfermedad con compromiso vital producto del consumo de alimentos contaminados [5, 6].

La infección por *Salmonella* comienza cuando ingresa al organismo mediante el consumo de agua y alimentos contaminados. Después de pasar por el estómago y llegar al intestino delgado, *Salmonella* es capaz de invadir la mucosa intestinal mediante su internalización en los enterocitos y principalmente a través de las células M. *Salmonella* provoca la

formación de proyecciones de membrana, lo cual culmina con la internalización de la bacteria en una vacuola [7]. Luego, *Salmonella* es transportada al subepitelio, principalmente hacia las placas de Peyer (**Figura 1**). En los serovares que causan gastroenteritis, generalmente la infección no procede más allá de la lámina propia. Por otra parte, los serovares capaces de generar infección sistémica, luego de atravesar la barrera epitelial y ser internalizados por los macrófagos residentes, expresan varios factores de virulencia que les permiten sobrevivir a la actividad antimicrobiana de los macrófagos y diseminarse hacia los nódulos linfáticos mesentéricos y posteriormente a través del sistema circulatorio a órganos tales como el bazo y el hígado [8, 9].

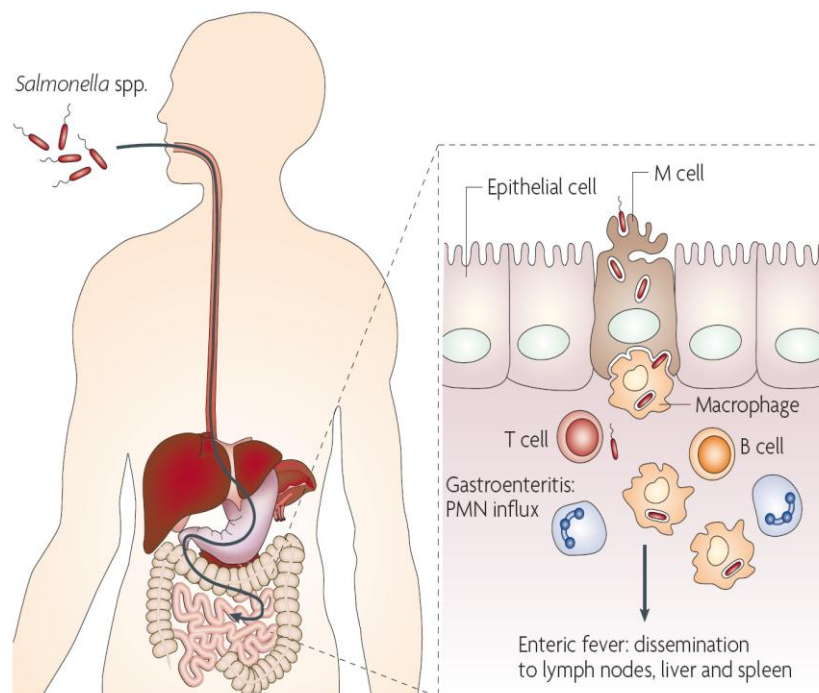


Figura 1. Representación esquemática del ciclo infeccioso de *Salmonella*. Luego de ser ingerida, *Salmonella* es capaz de sobrevivir al pH ácido del estómago alcanzando el intestino delgado. En el íleon distal *Salmonella* atraviesa la barrera intestinal preferentemente a través de las células M. La bacteria es transportada hacia las placas de Peyer subyacentes, donde se encuentra con células de sistema inmune como macrófagos, células B y T. Los serotipos capaces de generar infección sistémica se diseminan hacia los nódulos linfáticos y la sangre al interior de los macrófagos. Los serotipos que generan gastroenteritis generan una respuesta inmune local con fuerte inflamación, que culmina con la eliminación de la bacteria. **Adaptado de Haraga y cols, 2008 [9].**

La eliminación de *Salmonella* por parte del organismo en etapas tardías de la infección está relacionada a la respuesta inmune adaptativa del hospedero. En algunos casos, puede generarse una infección crónica en la cual el hospedero se convierte en un portador asintomático de la bacteria, la cual persiste en la vesícula biliar y puede ser eliminada a través de las heces durante un largo período de tiempo [8].

Durante el proceso de infección y diseminación en el hospedero la expresión de factores de virulencia codificados en material genético transferido horizontalmente es fundamental. Dentro de los elementos genéticos transferidos horizontalmente en *Salmonella* destacan los plasmidios de virulencia y las islas de patogenicidad. Los plasmidios de virulencia se encuentran sólo en algunos de los serovares de la subespecie *enterica*, son variados en tamaño y poseen una región llamada *spv* (*Salmonella* plasmid virulence), la cual es un importante factor de virulencia [10]. Por otra parte, las islas de patogenicidad de *Salmonella* ("SPI" por sus siglas en inglés) corresponden a islas genómicas contenidas en el cromosoma. Éstas pueden estar presentes en todos los serovares de *S. enterica* y *S. bongori*, como en el caso de SPI-1 [2], o estar presente solamente en algunos serovares, como en el caso de SPI-6 y SPI-19 [11].

Islas de patogenicidad de *Salmonella* y sistemas de secreción de proteínas.

Las islas de patogenicidad se caracterizan por poseer genes que contribuyen a la patogenicidad de la bacteria, estar asociados a elementos móviles como transposasas y profagos, tener una composición de bases distintas al resto del genoma (expresado en el porcentaje de guanina y citosina) y estar asociados frecuentemente a genes que codifican tRNAs [1].

Dentro de las islas de patogenicidad de *Salmonella*, las más estudiadas corresponden a SPI-1 y SPI-2. Cada una codifica un Sistema de Secreción de Tipo III (T3SS) que secreta proteínas efectoras directamente al citoplasma de las células del hospedero, lo cual permite a la bacteria manipular el curso de la infección. Ambos sistemas son esenciales para la virulencia de la bacteria y actúan en distintas etapas del proceso de infección [2].

El T3SS codificado en SPI-1 media la invasión de células no fagocíticas por un mecanismo de fagocitosis de tipo "trigger" [12]. Esto se logra mediante la inyección de efectores que modifican el citoesqueleto de la célula blanco y culminan con la internalización de la bacteria [13]. Por otro lado, el T3SS codificado en SPI-2 es necesario

para la supervivencia de la bacteria al interior de las células eucarióticas, desviando el tráfico endosomal y permitiendo a la bacteria sobrevivir en una vacuola especializada. El T3SS codificado en SPI-2 es necesario para el desarrollo de la infección sistémica, ya que permite a la bacteria sobrevivir al interior de macrófagos [9]. Se pueden encontrar otros sistemas de secreción codificados en las islas SPI-3, SPI-4, SPI-6 y SPI-19 [1, 11].

Los sistemas de secreción de proteínas son parte fundamental de las estructuras utilizadas por bacterias Gram negativo en su interacción con el hospedero y el ambiente. Hasta el momento se han descrito 6 sistemas de secreción presentes en bacterias Gram negativo (numerados de I a VI, **Figura 2**) [14].

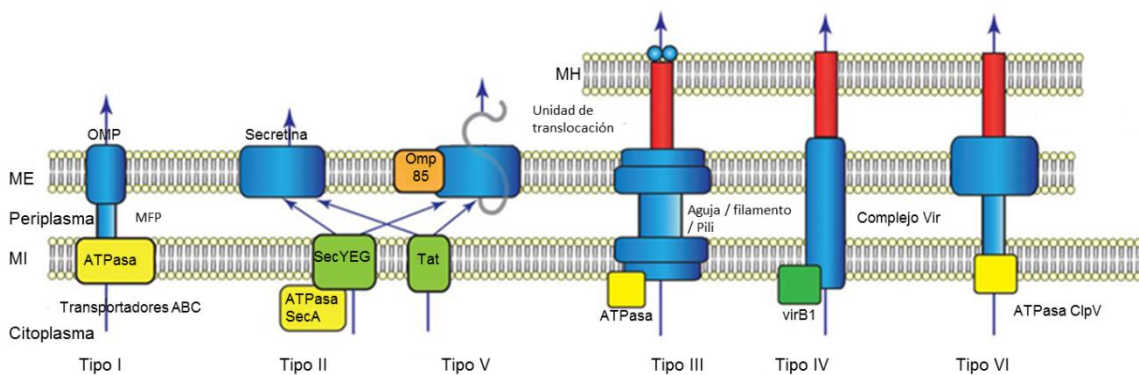


Figura 2. Representación esquemática de los seis sistemas de secreción presentes en bacterias Gram negativo. ME: membrana externa; MI: membrana interna; MH: membrana del hospedero. **Adaptado de Tseng y cols, 2009 [15].**

Los sistemas II y V secretan proteínas que contienen señales en su extremo N-terminal. Las proteínas secretadas por estos sistemas provienen de las vías de translocación Sec y Tat, las cuales reconocen dichas señales y translocan las proteínas hasta el periplasma. Posteriormente, estas proteínas son secretadas desde el periplasma por los sistemas II y V. El sistema tipo I está constituido por tres componentes básicos. El principal es un transportador del tipo ABC al cual se asocian las proteínas OMF (*Outer Membrane Factor*), las cuales actúan como un canal a través de la membrana externa, y las proteínas MFP (*Membrane Fusion Proteins*), que conectan al transportador ABC con las proteínas OMF. El sistema tipo III denominado “inyectisoma” tiene un origen evolutivo común con el flagelo. El inyectisoma está compuesto por una serie de anillos que atraviesan la membrana interna y externa de la bacteria, conectados a una aguja hueca,

un filamento o un pili, dependiendo de la especie [15]. El sistema tipo IV (T4SS) tiene la peculiaridad de que, además de translocar proteínas, es capaz de transportar ácidos nucleicos, generalmente mediante un mecanismo dependiente de contacto. Este sistema tiene 10 componentes fundamentales, los cuales se asocian para formar un canal que atraviesa ambas membranas y termina en un filamento superficial que se cree es el que establece contacto con la célula blanco. Luego de este contacto inicial, se propone que el canal se extiende para facilitar la translocación de los sustratos [16].

El Sistema de Secreción Tipo VI (T6SS) corresponde a una maquinaria macromolecular que actuaría como la cola contráctil de un fago a través de la cual se secretarían distintos efectores. Este sistema posee 13 componentes conservados, los cuales corresponden a los bloques fundamentales necesarios para ensamblar un T6SS funcional [17]. La búsqueda de T6SS mediante herramientas bioinformáticas ha llevado a su identificación en más de un cuarto de los genomas bacterianos conocidos [17] y, si bien se ha asociado a mecanismos de patogenicidad, también se encuentra en bacterias no patógenas, lo que sugiere funciones más amplias como la interacción con otros organismos (eucariontes o procariontes) presentes en el medio ambiente [18].

Entre los principales componentes de la maquinaria del T6SS se encuentran los productos de los genes *hcp*, *vgrG* y *clpV*. La proteína Hcp es uno de los componentes secretados por el sistema y tiene la capacidad de formar anillos hexaméricos en forma de barril beta, lo cual se ha determinado mediante cristalografía de rayos X [19]. También se ha observado por microscopía electrónica la formación de los anillos y túbulos en solución [20]. Esta evidencia, sumado a la similitud estructural de la proteína Hcp con la proteína gpV de la cola del fago λ [21], sugiere que Hcp es capaz de formar estructuras tubulares *in vivo* que generarían un canal a través del cual pueden pasar las moléculas efectoras.

La proteína VgrG tiene similitud con las proteínas gp27 y gp5, las cuales forman la punta de la cola del fago T4. Estas proteínas se encuentran fusionadas en la proteína VgrG [22], lo que sugiere que ésta actúa como la punta de una aguja que permite la penetración de membranas biológicas. Existe un subgrupo de estas proteínas que tienen un dominio adicional en el extremo C-terminal. Estos dominios están asociados a una gran cantidad de funciones biológicas, como el entrecruzamiento de actina, la ADP-ribosilación de proteínas o la unión a manosa, entre otras [22, 23]. Estas proteínas con un dominio C-terminal adicional se han llamado “VgrG evolucionadas” y se cree que este dominio

adicional les permitiría actuar directamente como efectores. Esto ha sido comprobado en el caso de VgrG1 y su dominio entrecruzador de actina presente en *Vibrio cholerae* [22].

Por otra parte, la proteína ClpV es un componente esencial del T6SS que pertenece a la familia de ATPasas AAA+ (*ATPases Associated with diverse cellular Activities*) [24]. Estas proteínas forman estructuras hexaméricas con forma de anillo y remodelan o translocan substratos convirtiendo la energía química del ATP en energía mecánica [25]. ClpV es capaz de remodelar los complejos formados por las proteínas VipA y VipB (los cuales también son componentes esenciales del T6SS). Por su parte, la estructura de VipA/B es similar a la vaina contráctil de la cola del fago T4, por lo cual es probable que la secreción este mediada por un proceso similar a la contracción de la cola del fago T4 [20]. Recientemente se ha demostrado la formación de una estructura similar a una cola contráctil en el T6SS de *V. cholerae* y se determinó que ClpV es indispensable para reciclar este complejo molecular posteriormente a la contracción de esta estructura [26].

Existen otros componentes conservados en este sistema los cuales también se encuentran presentes en los T4SS, estos son DotU (TssL) e IcmF (TssM), los cuales forman un complejo en la membrana interna de la bacteria. La función ATPasa de IcmF es necesaria para el reclutamiento de Hcp al complejo IcmF-DotU y permite la translocación de Hcp [27].

Esta información ha llevado a la formulación de un modelo de funcionamiento de los T6SS homólogo al utilizado por los fagos para la penetración de membranas biológicas (**Figura 3**).

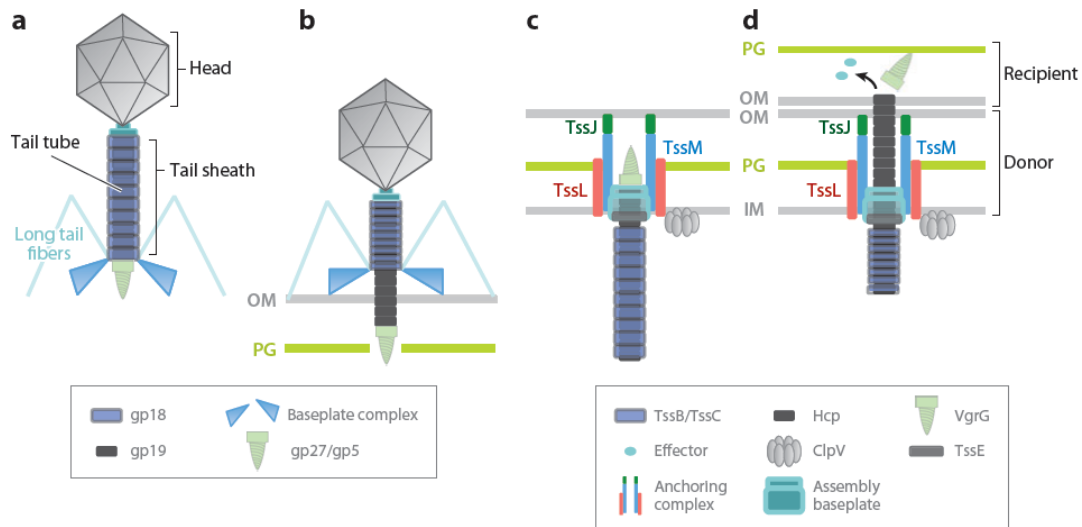


Figura 3. Modelo del T6SS y su similitud al bacteriófago T4. a) Representación del bacteriófago T4 y b) su mecanismo para inyectar DNA en la bacteria blanco por medio de la contracción de la cola; y modelo del T6SS en su estado c) inactivo y d) activo. Las proteínas homólogas entre ambos se encuentran coloreadas iguales. **Adaptado de Silverman y cols, 2012 [28].**

Sistemas de Secreción Tipo VI en *Salmonella*.

La primera descripción de un T6SS en *S. enterica* corresponde a la caracterización de la isla SCI (*Salmonella centisome 7 island*), posteriormente renombrada SPI-6, la cual se encuentra en el genoma de *S. Typhimurium* inserta en el gen del tRNA-*aspV* [29]. SPI-6 es una isla de patogenicidad de ~47 kb que contiene 37 ORFs entre los que se encuentra el operón fimbrial *saf*. Muchas de las proteínas codificadas en esta isla corresponden a proteínas periplásmicas, de membrana interna y externa, lo que sugirió la presencia de un sistema de secreción codificado dentro de esta isla [29, 30]. Posteriormente, se determinó que SPI-6 corresponde a un “cluster” IAHP (*lcmF-associated homologous proteins*) [31]. Por último, con el descubrimiento de los T6SS y su asociación a los “clusters” IAHP se dedujo que SPI-6 codifica un T6SS [32].

Un análisis bioinformático realizado en nuestro laboratorio, utilizando las secuencias completas de los genomas de 24 serovares de *Salmonella enterica*, encontró T6SS en 20 de ellos. Se encontraron 4 T6SS distintos: el previamente descrito en SPI-6 y 3 nuevos, los que se localizan en las islas genómicas SPI-19, SPI-20 y SPI-21. La presencia de

estas islas en *Salmonella* dista de ser homogénea; 16 de los serovares contienen a SPI-6 y 5 contienen SPI-19, todos pertenecientes a la subespecie *enterica* (I). A su vez SPI-20 y SPI-21 están restringidas a la subespecie *arizonae* (IIIa). Algunos serovares contienen dos T6SS en sus genomas. Éstos son: Weltevreden, Dublin (SPI-6 y SPI-19) y Arizona 62:z4,z23:- (SPI-20 y SPI-21). Por otra parte, algunos serovares no codifican ningún T6SS. Estos son: Paratyphi B, Virchow, Javiana (subespecie *enterica*) y 61:1,v:1,5,(7) (subespecie *díarizonae*) [11]. Por otra parte *S. bongori* posee un T6SS codificado en SPI-22 [33].

El análisis filogenético de las islas utilizando las secuencias aminoacídicas concatenadas de VipA y VipB (los componentes más conservados dentro de los T6SS), permitió clasificar los T6SS codificados en *Salmonella* dentro de los cuatro grupos filogenéticos descritos anteriormente por Bingle y cols. [34]. El T6SS de SPI-6 se asocia al grupo A, el de SPI-19 al grupo D, los de SPI-20 y SPI-21 se asocian al grupo C y el de SPI-22 al grupo B [11, 33]. Esto sugiere distintos orígenes evolutivos e independientes para los T6SS en el género *Salmonella*.

La participación del T6SS codificado en SPI-6 en la patogenicidad de *Salmonella* no está claramente definida debido a antecedentes contradictorios en la literatura. Se ha reportado que deleciones de la isla completa disminuyen la capacidad de invasión de células epiteliales [29]. Sin embargo, debido a que estas mutantes carecen también de los genes correspondientes al operón fimbrial *saf*, no es posible concluir si la eliminación del sistema de secreción es efectivamente responsable de este efecto. Por otro lado, se observó que una mutante de *S. Typhimurium* en el gen *sciS*, que codifica para un homólogo del componente *lcmF*, era hipervirulenta en un modelo murino de infección [35]. Sin embargo, se ha reportado que mutantes de *S. Typhimurium* en *STM0272* (homólogo de *clpV*) tienen una replicación atenuada dentro del macrófago, al igual que mutantes en *STM0291* (elemento *rhs*, de *recombination hot spot*) [36]. Finalmente, un trabajo reciente [37], así como resultados no publicados de nuestro laboratorio, indican que mutantes en genes del T6SS de *S. Typhimurium* son atenuadas en ratón.

Con respecto a SPI-19, estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que el T6SS codificado en SPI-19 de *S. Gallinarum* favorece la colonización de aves [38] y la supervivencia en el interior de macrófagos en cultivo [39]

A partir de estos antecedentes se puede inferir que los T6SS codificados en las islas SPI-6 de *S. Typhimurium* y SPI-19 de *S. Gallinarum* contribuyen a la patogenicidad en sus respectivos hospederos. Ambas islas de patogenicidad son necesarias para la colonización de órganos internos y la infección sistémica.

En esta Tesis nos hemos centrado en investigar la participación de los T6SS en la capacidad de *S. Dublin* de invadir y sobrevivir al interior de macrófagos *in vitro*. Como se mencionó, este serovar contiene en su genoma dos T6SS: uno codificado en la isla SPI-6 y otro en la isla SPI-19. Esto lo convierte en modelo para estudiar la contribución relativa de estos sistemas a la patogenicidad de la bacteria. Más aún, debido a que ambos T6SS son filogenéticamente distintos, su estudio puede dar luces acerca de si ellos son redundantes o no en su función.

HIPÓTESIS

Los Sistemas de Secreción Tipo VI codificados en las islas genómicas SPI-6 y SPI-19 de *Salmonella enterica* serovar Dublin se expresan al interior de macrófagos murinos y contribuyen a la capacidad de invadir y proliferar en su interior.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si los Sistemas de Secreción Tipo VI codificados en SPI-6 y SPI-19 de *Salmonella enterica* serovar Dublin se expresan al interior de macrófagos y determinar si contribuyen a la invasión y supervivencia de la bacteria al interior de estas células.

OBJETIVO ESPECÍFICOS

- 1- Determinar la expresión al interior de macrófagos de la proteína VgrG, componente del Sistema de Secreción Tipo VI, codificados en las islas SPI-6 y SPI-19 de *S. Dublin*.
- 2- Determinar la funcionalidad de cada uno de los Sistemas de Secreción Tipo VI de *S. Dublin* mediante un ensayo de secreción citoplasmática de VgrG.
- 3-Evaluar la participación de los Sistemas de Secreción Tipo VI codificados en las islas SPI-6 y SPI-19 de *S. Dublin* en la invasión y supervivencia dentro de macrófagos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Reactivos

De Becton Dickinson Labware (Franklin Lakes, NJ, EEUU) se obtuvo: placas desechables de 96 pocillos para cultivo celular.

De Biotium Inc. (Hayward, CA, EEUU) se obtuvo: GelRed.

De Difco Laboratories (Detroit, MI, EEUU) se obtuvo: triptona, extracto de levadura y Bacto-Agar.

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

De Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, EEUU) se obtuvo: oligonucleótidos partidores.

De Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EEUU) se obtuvo: Azul de Tripán.

De Kapa Biosystems (Boston, MA, EEUU) se obtuvo: DNA polimerasa KAPA HiFi.

De Merck Química Chilena Soc. Ltda. se obtuvo: cloruro de sodio, glicerol, ácido clorhídrico, formaldehído, acetato de sodio y etanol absoluto.

De New England Biolabs (Ipswich, MA, EEUU) se obtuvo: DNA ligasa T4.

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

De Oxoid Limited (Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) se obtuvo: sistema de generación de anaerobiosis Anaerogen.

De Omega Bio-Tek se obtuvo: kit de extracción plasmidial E.Z.N.A. Plasmid Miniprep.

De Pierce Biotechnology (Rockford, IL, EEUU) se obtuvo: sustrato quimioluminiscente SuperSignal West-Pico y película fotográfica CL-XPosure.

De Promega (Madison, WI, EEUU) se obtuvo: Go-Taq DNA polimerasa, dNTPs y kit de purificación de productos de PCR Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System.

De Rockland Immunochemicals (Gilbertsville, PA, EEUU) se obtuvo: anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa.

De Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU) se obtuvo: kanamicina, ampicilina, cloranfenicol, L-arabinosa, β -mercaptoetanol, azul de bromofenol, xileno-cianol, persulfato de amonio (APS), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED), tricina y ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA).

De Thermo Scientific HyClone (Waltham, MA, EEUU) se obtuvo: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, High glucose), suero fetal bovino (SFB) y PBS 10x.

De Thermo Scientific (ex Fermentas) (Waltham, MA, EEUU) se obtuvo: enzimas de restricción *XhoI* y *NdeI*.

De Vector Laboratories (Burlingame, CA, EEUU) se obtuvo: medio de montaje Vectashield con DAPI.

2.2 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se encuentran señaladas en la Tabla 1. Las bacterias se crecieron rutinariamente en medio Luria-Bertani (LB; 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl) a 37°C con agitación. El medio LB se suplementó con ampicilina (Amp; 100 μ g/mL), cloranfenicol (Cam; 20 μ g/mL), kanamicina (Kan; 50 μ g/mL) o trimetoprim (Tm; 100 μ g/mL), según correspondiese. El Agar Luria se obtuvo mediante la adición de 15 g/L de agar al medio LB.

Para los ensayos de invasión y supervivencia, las cepas se crecieron en medio LB a 37°C con agitación toda la noche y posteriormente se inocularon 200 μ L de este cultivo en 5 mL de medio LB fresco el cual se dejó en condiciones de anaerobiosis a 37°C durante 3 h.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en la presente Tesis.

Cepa	Característica	Fuente o referencia
S. Dublin CT_02021853	Cepa silvestre, secuenciada	Stock de laboratorio
S. Dublin <i>ssaG-gfp_{td}</i>	CT_02021853 con la fusión traduccional de <i>ssaG-gfpmut3</i> FRT	Stock de laboratorio
S. Dublin SPI-6 <i>vgrG-gfp_{td}</i>	CT_02021853 con la fusión traduccional de <i>vgrG_{SPI-6}-gfpmut3</i> FRT	Este trabajo
S. Dublin SPI-6 <i>vgrG-gfp_{ts}</i>	CT_02021853 con la fusión transcripcional de <i>vgrG_{SPI-6}::gfpmut3</i> FRT	Este trabajo
S. Dublin SPI-19 <i>vgrG-gfp_{td}</i>	CT_02021853 con la fusión traduccional de <i>vgrG_{SPI-19}-gfpmut3</i> FRT	Stock de laboratorio
S. Dublin SPI-19 <i>vgrG-gfp_{ts}</i>	CT_02021853 con la fusión transcripcional de <i>vgrG_{SPI-19}::gfpmut3</i> FRT	Stock de laboratorio
S. Dublin pFT	CT_02021853 /pFlagTEM, Cm ^R	Este trabajo
S. Dublin pSipAFT	CT_02021853 /pSipAFT, Cm ^R	Este trabajo
S. Dublin pVgrGFT _{SPI-6}	CT_02021853 /pVgrGFT _{SPI-6} , Cm ^R	Este trabajo
S. Dublin pVgrGFT _{SPI-19}	CT_02021853 /pVgrGFT _{SPI-19} , Cm ^R	Este trabajo
S. Dublin Δ <i>clpV</i> _{SPI-6} pVgrGFT _{SPI-6}	CT_02021853 Δ <i>clpV</i> _{SPI-6} ::FRT / pVgrGFT _{SPI-6} , Cm ^R	Este trabajo
S. Dublin Δ <i>clpV</i> _{SPI-6}	CT_02021853 Δ <i>clpV</i> _{SPI-6} ::FRT	Stock de laboratorio
S. Dublin Δ <i>clpV</i> _{SPI-19}	CT_02021853 Δ <i>clpV</i> _{SPI-19} ::FRT	Este trabajo
S. Dublin Δ <i>clpV</i> _{SPI-6} Δ <i>clpV</i> _{SPI-19}	CT_02021853 Δ <i>clpV</i> _{SPI-6} ::FRT Δ <i>clpV</i> _{SPI-19} :: <i>aph</i>	Este trabajo
S. Dublin Δ SPI-6	CT_02021853 Δ SPI-6::FRT	Stock de laboratorio
S. Dublin Δ SPI-19	CT_02021853 Δ SPI-19::FRT	Stock de laboratorio
S. Dublin Δ SPI-6 Δ SPI-19	CT_02021853 Δ SPI-6:: <i>cat</i> Δ SPI-19::FRT	Stock de laboratorio
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> λ ⁻	Stock de laboratorio
<i>E. coli</i> DH5 α / pVgrGFT _{SPI-6}	DH5 α / pVgrGFT _{SPI-6} , Cm ^R	Este trabajo

2.3 Plasmidios

Los plasmidios utilizados en esta Tesis se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Plasmidios utilizados en la presente Tesis.

Plasmidio	Características	Fuente o referencia
pKD46	<i>bla</i> P _{BAD} <i>bet</i> <i>exo</i> pSC101 oriT ^S , Amp ^R	[40]
pVgrGFT _{SPI-6}	<i>cat</i> P _{trc} <i>vgrG</i> _{SPI-6} - <i>3xFlag-TEM-1</i> , Cm ^R	Este trabajo
pVgrGFT _{SPI-19}	<i>cat</i> P _{trc} <i>vgrG</i> _{SPI-19} - <i>3xFlag-TEM-1</i> , Cm ^R	Stock de laboratorio
pSipAFT	<i>cat</i> P _{trc} <i>3xFlag-sipA-β-lactamasa TEM-1</i> , Cm ^R	[41]
pLZ01	<i>bla</i> FRT <i>aph</i> FRT ori _{R6K} , Amp ^R , Kan ^R	Stock de laboratorio
pmCherry	Posee el fluoróforo mCherry bajo expresión constitutiva, Amp ^R	Stock de laboratorio
pFlagTEM	<i>cat</i> P _{trc} <i>3xFlag TEM-1</i> , Cm ^R	[41]
pCP20	<i>bla cat</i> cl857 IPR <i>flp</i> pSC101 oriT ^S , Cam ^R , Amp ^R	[42]
pCLF4	<i>bla</i> FRT <i>aph</i> FRT ori _{R6K} , Amp ^R , Kan ^R	Stock de laboratorio

2.4 Partidores

Los partidores utilizados para las distintas amplificaciones mediante PCR se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Partidores utilizados en la presente Tesis.

Nombre	Secuencia
vgrG_14028rv	CGGTATGGTTCGATCCATGAGAACTCCAGGTTTAAT TCAGACGTGTAGGCTGGAGCTGCTT
VgrG-GFP_bptd F	TAACCGCCGATGATATTGCCCCCTTCCCACCTCT GAGATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTT
VgrG-GFP_bpts F	TTAATCCGGTATTAAGGAGTCACTACCATGAGTTT TGTATAAGGAGGCTGTCATGAGTAAAGGAGAAGAA CTTTTC
VgrG-FoK1R_bpts P1inv	GTTCATTGCCCTCCAGGATA GAAGCAGCTCCAGCCTACAC
NdeI_Vgrg_SPI6_Dub_Tm14_Fwd	GGAATTCCATATGAGTTTTGTATCCACAAA
XhoI_Vgrg_SPI6_Dub_rev	CCGCTCGAGCTCAGAGGTGGGAAGGGG
Flagtem_MCS_out5	TGTTGCCCGTCTCACTGGTG
Flagtem_MCS_out3	CCACTCGTGCACCCAAGTGA
VgrG_SPI6_Out5_check	TACCAGCGATGTCATGCAAC
SG1034_(H1+P1)	ATGATCCAGATTGACTTAGCCACCCTGGTAAAACG GCTTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
SG1034_(H2+P2)	TCATAGAACGGCTTCGTCCTCTGCTTCCGCTACGG GCTGACATATGAATATCCTCCTTAG
SG1034_Out5 K1	TCCTTACCTGGCAAGCAGCC CAGTCATAGCCGAATAGCCT

2.5 Generación de mutantes en genes de los Sistemas de Secreción Tipo VI codificados en las islas de patogenicidad SPI-6 y SPI-19

2.5.1 Obtención de los productos de PCR

Los partidores para las reacciones de PCR presentaban 40 nt de homología con los extremos de la secuencia a eliminar y 20 nt de homología al extremo 5' o 3' de un *cassette* de resistencia a Kan flanqueado por sitios FRT (*Flp recombinase target sequence*) presente en el plasmidio pCLF4 (GenBank ID: EU629214). Las amplificaciones por PCR se realizaron utilizando pCLF4 como templado, según el siguiente protocolo:

Mezcla de reacción y Protocolo de amplificación

Concentración inicial	μL	Concentración final			
Agua	64		95°C	5 min	35 ciclos
Amortiguador Go-Taq 5x	20	1x	95°C	30 s	
MgCl ₂ (25 mM)	7,5	1,875 mM	55°C	30 s	
Partidor 1 (10 μM)	2	0,2 μM	72°C	2,5 min	
Partidor 2 (10 μM)	2	0,2 μM	72°C	10 min	
dNTPs (10 mM)	2	200 μM	20°C	∞	
DNA plasmidial	2				
Go-Taq DNA polimerasa	0,5				
Volumen final	100,0				

2.5.2 Mutagénesis

La cepa mutante en el gen *clpV* (SeD_A1221) codificado en SPI-19 se construyó mediante la técnica de reemplazo alélico “*Red Swap*” descrita por Datsenko y Wanner [40]. Primero, se transformó la cepa *S. Dublin* CT_02021853 con el plasmidio termosensible pKD46, el cual permite la expresión del sistema de recombinación Red del fago lambda en presencia de L-arabinosa. La cepa transformada se creció hasta una OD₆₀₀ de 0,5 en medio LB con Amp a 30°C, se agregó L-arabinosa a una concentración final de 10 mM y se incubó durante 2 h. Luego, las bacterias se hicieron electrocompetentes mediante lavados secuenciales en agua destilada estéril y se

transformaron por electroporación con un producto de PCR amplificado a partir de pCLF4 usando los partidores SG1034_(H1+P1) y SG1034_(H2+P2) (Tabla 3). Posteriormente, las bacterias se recuperaron en medio LB a 37°C durante 1 h para luego ser sembradas en agar LB suplementado con Kan. La generación de la cepa doble mutante de *c/pV* codificado en SPI-6 y SPI-19 se realizó mediante la transducción generalizada de la mutación $\Delta c/pV_{SPI-19}$ sobre la mutante de *c/pV_{SPI-6}* (Tabla 1).

2.5.3 Comprobación de la mutagénesis

El reemplazo alélico se confirmó mediante PCR, a partir de una suspensión bacteriana de una colonia resistente en 80 μ L de H₂O, utilizando un partidor interno al *cassette* de resistencia y uno externo al sitio mutagenizado (Tabla 3, partidores K1 y SG_1034_Out5, respectivamente) según el siguiente protocolo:

Mezcla de reacción y Protocolo de amplificación

Concentración inicial	μ L	Concentración final			
Agua	9,4		95°C	5 min	
Amortiguador Go-Taq 5x	4	1x	95°C	30 s	35 ciclos
MgCl ₂ (25 mM)	1,2	1,875 mM	55°C	30 s	
Partidor 1 (10 μ M)	0,4	0,2 μ M	72°C	1 min por cada 1000 pb	
Partidor 2 (10 μ M)	0,4	0,2 μ M	72°C	10 min	
dNTPs (10 mM)	0,4	200 μ M	20°C	∞	
Suspensión bacteriana	4				
Go-Taq DNA polimerasa	0,2				
Volumen final	20,0				

2.5.4 Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de amplificación se resolvieron en geles de agarosa 1% o 1,5% en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). Las muestras de DNA a analizar se mezclaron con el volumen adecuado de tampón Blue II 10X (glicerol 20% (v/v), azul de bromofenol 0,25% (p/v), xilencianol 0,25% (p/v), EDTA 0,1 M) antes de ser cargadas en el gel. La electroforesis se realizó a 100 V constantes durante 50 min y luego el gel se tiñó

por 5 min en una solución de bromuro de etidio (5 µg/mL) o de Gel Red (3X). Las bandas de DNA se visualizaron y se fotografiaron sobre un transiluminador UV.

2.5.5 Generación de lisados del fago P22 y transducción generalizada

Una vez confirmada la mutación del gen de interés por la inserción del *cassette* de resistencia, cada mutación fue transferida a la cepa silvestre mediante transducción generalizada. Para esto, se obtuvieron lisados del fago P22 mezclando 200 µL de un cultivo en fase estacionaria de la mutante con 1 mL de P22 broth (100 mL medio LB, 2 mL medio E 50x, 1 mL Glucosa 20% y 0,1 mL lisado de fago P22 HT *int*). Se dejó creciendo durante 8 a 16 h con agitación a 37°C y posteriormente se lisaron las bacterias utilizando cloroformo. Se centrifugó el lisado a 13.000 RCF para separar los restos celulares, se recuperó el sobrenadante y se guardó a 4°C.

Para las transducciones, una alícuota de 200 µL de un cultivo en estado estacionario de la cepa silvestre de *S. Dublin* CT_02021853 se mezcló con 5 µL de lisado obtenido a partir de la cepa dadora correspondiente y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 15 min para permitir la adsorción del fago. Posteriormente, se incubó durante 1 h a 37°C y luego se sembraron las bacterias en placas de agar LB suplementadas con Kan. Las transductantes se limpiaron de partículas de fago mediante crecimiento en placas EBU [43].

2.5.6 Eliminación del *cassette* de resistencia a antibiótico

Una vez transferida la mutación a un fondo genético limpio, el gen de resistencia a Kan se eliminó transformando cada mutante con el plasmidio pCP20, el cual codifica la recombinasa FLP. Las transformantes se sembraron en placas de agar LB suplementadas con Amp e incubadas a 30°C. Posteriormente, colonias individuales se repicaron a 42°C en agar LB, agar LB suplementado con Amp y agar LB suplementado con Kan. Se seleccionaron las colonias que sólo crecieron en agar LB.

2.6 Construcciones de fusiones VgrG-GFP

2.6.1 Obtención de los productos de PCR

Se utilizó como templado el plasmidio pLZ01, el cual posee el reportero *gfp* seguido del gen *cat* que confiere resistencia a cloranfenicol flanqueado por sitios FRT. Para las fusiones transcripcionales, el partidor “*forward*” posee 40 nt que aparean con el extremo 5’ del gen, un codón de término para el gen, un sitio de unión al ribosoma y 20-22 nt que aparean con el reportero *gfp* codificado en el plasmidio pLZ01 (Tabla 3, partidor VgrG-GFP_bpts F). En el caso de las fusiones traduccionales, el partidor “*forward*” posee 40 nt que aparean con el extremo 3’ del gen y no contiene el sitio de unión al ribosoma de tal forma que se elimina el codón de término para el gen (Tabla 3, partidor VgrG-GFP_bptd F) y el gen reportero queda en el mismo marco de lectura. El partidor “*reverse*” posee 21 nt que aparean con el plasmidio pLZ01 y 40 nt que aparean con el extremo 3’ del gen (Tabla 3, partidor vgrG_14028rv). La integración del amplicón resulta en la inserción del gen reportero y la resistencia a antibiótico río abajo del gen a estudiar. Para la reacción de PCR se utilizó el siguiente protocolo:

Mezcla de reacción y Protocolo de amplificación

Concentración inicial	μL	Concentración final			
Agua	68		95°C	5 min	
Amortiguador Fi 5x	20	1x	95°C	30 s	35 ciclos
Partidor “ <i>forward</i> ” (10 μM)	3	0,3 μM	55°C	30 s	
Partidor “ <i>reverse</i> ” (10 μM)	3	0,3 μM	72°C	1 min por cada 1000 pb	
dNTPs (10 mM)	3	300 μM	72°C	5 min	
DNA plasmidial	1		20°C	∞	
DNA polimerasa KAPA HiFi	2				
Volumen final	100				

2.6.2 Mutagénesis

Las fusiones transcripcionales (ts) y traduccionales (td) entre la proteína fluorescente verde (GFP) y el marco de lectura del componente VgrG se construyeron mediante una modificación del método de “*Red Swap*” descrito anteriormente (Sección 2.5.2). Al igual que en la técnica de remplazo alélico, las bacterias se transformaron con el plasmidio pKD46. Luego, se incubaron en presencia de L-arabinosa y se transformaron con los productos de PCR generados.

2.6.3 Comprobación de la mutagénesis

El reemplazo alélico se confirmó mediante PCR utilizando un partidador interno al amplicón insertado y uno externo al sitio mutagenizado (Tabla 3, partidores P1inv y VgrG-FoK1R_bpts, respectivamente) según el protocolo descrito anteriormente (Sección 2.5.3). Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa de la manera descrita anteriormente (Sección 2.5.4). Las mutantes poseedoras de la fusiones se nombraron de la siguiente manera: SD *vgrG-gfp_{td}* o SD *vgrG-gfp_{ts}* para las fusiones traduccionales y transcripcionales, respectivamente y anteponiendo el nombre de la isla en la cual se insertó el reportero (SPI-6 o SPI-19).

2.7 Generación del vector pVgrGFT para ensayos de translocación

2.7.1 Clonamiento del marco de lectura de *vgrG* en el vector pFlagTEM

Se amplificó a partir del genoma de *S. Dublin* CT_02021853 el marco de lectura de *vgrG* utilizando partidores que agregan sitios de corte para las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* en el extremo 3' y 5' respectivamente (Tabla 3, partidores *NdeI_Vgrg_SPI6_Dub_Tm14_Fwd* y *XhoI_Vgrg_SPI6_Dub_rev*), utilizando el protocolo descrito anteriormente (Sección 2.6.1). Posteriormente, tanto el producto de PCR como el plasmidio pFlagTEM (GenBank ID: EU440730) se incubaron durante toda la noche con las enzimas *XhoI* y *NdeI* (2,1 µL *XhoI*, 1,05 µL *NdeI*, 25 µL DNA y 4,1 µL tampón 0 10X). Luego de la digestión, se ligaron ambos productos (11 µL de producto de PCR digerido, 6

μL de plasmidio digerido, 2 μL de tampón T4 10x y 1 μL de T4 DNA ligasa) incubando toda la noche a 4°C. El producto de esta ligación se transformó en la cepa *Escherichia coli* DH5 α . Se seleccionaron colonias resistentes a Cam y se confirmó la presencia de la fusión en el plasmidio mediante PCR (Tabla 3, partidores Flagtem_MCS_out3, VgrG_SPI6_Out5_check y Flagtem_MCS_out5) utilizando el protocolo descrito anteriormente (Sección 2.5.3). Posteriormente, se realizó un análisis mediante Western blot para evaluar la producción de la proteína de fusión VgrG-Flag-TEM.

2.7.2 Preparación de muestras de proteínas

Las cepas bacterianas (Tabla 1, cepas S. Dublin CT_02021853, S. Dublin pFT y S. Dublin pVgrGFT_{SPI-6}) se cultivaron a 37°C con agitación durante toda la noche en 5 mL de LB suplementado con glucosa al 1%. En el caso de las cepas con plasmidio, el medio se suplementó con Cam. Estos cultivos se utilizaron para inocular LB fresco suplementado con glucosa 1% en los casos correspondientes (inoculado a una razón de 1:1.000) y se incubó a 37°C con agitación. En el caso de las cepas con plasmidio el medio se suplementó con Cam. Cuando las bacterias alcanzaron una OD₆₀₀ \approx 0,6 se agregó IPTG a las cepas correspondientes a una concentración final de 0,5 mM y se continuó la incubación durante 2 h. Posteriormente, se sedimentaron las bacterias mediante centrifugación y se eliminó el sobrenadante de cultivo. Se procedió a lavar 2 veces con NaCl 0,85% y se pesó el sedimento bacteriano obtenido. Se resuspendieron las bacterias en NaCl 0,85% dejando la suspensión a una concentración de 0,1 gramos de peso húmedo por mL. Se mezcló la suspensión con tampón de Laemmli 5x a una razón 4:1 (concentraciones finales: Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,01%, β -mercaptoetanol 5%). Las muestras se hirvieron durante 10 min y se almacenaron a 4° C hasta su utilización.

2.7.3 Electroforesis SDS-PAGE

Las electroforesis en geles desnaturalantes de poliacrilamida se realizaron en una cámara mini-Protean III (BioRad) de acuerdo a la fórmula descrita abajo. Primero, se cargó la mezcla del gel resolutive y se cubrió con 200 μL de isopropanol. Una vez polimerizada la

acrilamida, se retiró el isopropanol y se cargó la mezcla del gel concentrador. Se utilizó tampón de corrida Tris-glicina para proteínas (glicina 1,44%, Tris 0,3%, SDS 0,1%) y se cargaron 5 µL de las muestras de proteínas preparadas como se describió anteriormente. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 V hasta que el frente de corrida, señalado por la migración del azul de bromofenol, llegara al final del gel resolutivo.

Geles de Poliacrilamida

	Gel resolutivo 10%	Gel Concentrador 4%
H ₂ O	1900 µL	680 µL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 SDS 0,4%	1350 µL	-
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 SDS 0,4%	-	270 µL
Acrilamida/Bisacrilamida (30:0,8) 30%	1700 µL	430 µL
TEMED	2 µL	2 µL
PSA 10%	50 µL	20 µL

2.7.4 Transferencia a membranas de PVDF y bloqueo

Se realizó la transferencia de proteínas desde un gel SDS-PAGE a una membrana de PVDF en una cámara Mini Trans-Blot de BioRad. La membrana de PVDF se activó previamente en metanol por 15 s. La transferencia se realizó con tampón de transferencia (glicina 1,44%, Tris 0,3%, SDS 0,01% y metanol 20%) por 65 min a 230 mA. Luego de la transferencia, la membrana se bloqueó con 50 mL de una solución de leche descremada 5% en tampón TBS (Tris 25 mM pH 8, NaCl 125 mM) agitando suavemente por 90 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó la membrana 3 veces durante 15 min con TBS.

2.7.5 Inmunodetección por quimioluminiscencia

La membrana se incubó con el anticuerpo primario anti-FLAG M2 diluido 1:10.000 en TBS durante 2 h a temperatura ambiente con agitación. Se lavó la membrana con una solución de BSA 5% en TBS cinco veces durante 5 min. Posteriormente, la membrana se incubó por 2 h a temperatura ambiente con agitación con el anticuerpo secundario anti-IgG de

ratón conjugado a peroxidasa de rábano diluido 1:125.000 en TBS, luego de lo cual se procedió a lavar 3 veces durante 15 min con TBS. Para la inmunodetección se utilizó el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West-Pico con exposición en película CL-XPosure.

2.8 Ensayos de infección *in vitro*

2.8.1 Condiciones de cultivo celular

Se utilizó la línea celular RAW264.7 (ATCC TIB-71) derivada de macrófagos murinos. Las células se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con alta concentración de glucosa (584 mg/L L-glutamina, 4.500 mg/L glucosa, 110 mg/L piruvato de sodio) suplementado con 8% SFB inactivado y una solución de antibiótico/antimicótico (10 U/mL penicilina, 10 µg/mL estreptomina, 25 µg/mL anfotericina B) a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂.

2.8.2 Ensayos de internalización y supervivencia intracelular de cepas de *S. Dublin* en macrófagos murinos RAW 264.7

El ensayo utilizado se basó en el protocolo descrito por Schwan y cols [44]. Se sembraron ~250.000 macrófagos RAW 264.7 por pocillo en una placa de 48 pocillos, o 100.000 macrófagos por pocillo en una placa de 96 pocillos. Luego, se incubaron durante 20 h, obteniendo al día siguiente un ~70% de confluencia entre las células. Previo a la infección, las cepas bacterianas se crecieron toda la noche a 37°C en LB estático (Tabla 1, cepas *S. Dublin* CT_02021853 y las mutantes $\Delta clpV_{SPI-6}$, $\Delta clpV_{SPI-19}$, $\Delta clpV_{SPI-6} \Delta clpV_{SPI-19}$, $\Delta SPI-6$, $\Delta SPI-19$ y $\Delta SPI-6 \Delta SPI-19$). El día del ensayo se inocularon 200 µL de cada cultivo bacteriano en 5 mL de LB y se incubó durante 3 h a 37°C en anaerobiosis (OD₆₀₀ final ≈ 0,3). Se midió la densidad óptica de las bacterias y se calculó la cantidad necesaria para alcanzar una multiplicidad de infección (MOI) de 50 bacterias por macrófago. El volumen de cultivo calculado se centrifugó, las bacterias se lavaron con PBS y se resuspendieron en medio DMEM suplementado con 8% SFB. Posteriormente, se agregó la suspensión bacteriana a los macrófagos, se centrifugaron las placas a 250 x RCF por 10 min y se dejó proceder la infección durante 45 min a 37°C en una

atmósfera con 5% de CO₂. Para evaluar la internalización, pasado este período se eliminaron las bacterias extracelulares lavando 3 veces con PBS suplementado con gentamicina (200 µg/mL) y se dejó incubando las células por 1 h en medio suplementado con gentamicina (200 µg /mL). Pasado este tiempo, se lisaron las células con desoxicolato de sodio 0,5%. Para evaluar la supervivencia intracelular, luego de la incubación de 1 h (t1) con gentamicina se lavaron las células con PBS y se dejaron incubando en medio con gentamicina (10 µg/mL) por 20 h (t21). A continuación, las células se lisaron como se indicó anteriormente. Se sembraron diluciones seriadas en PBS de todos los lisados en placas de agar LB para el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC). Se reservó un pocillo de macrófagos infectados por cepa para realizar un recuento de las células viables mediante exclusión de azul de Tripán y recuento en cámara de Neubauer.

La internalización de las cepas se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ internalización} = 100 * \frac{\text{UFC a t1}}{\text{UFC inoculadas}}$$

La supervivencia intracelular de las cepas se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Indice de sobrevivida} = \frac{\text{UFC a t21}}{\text{N}^\circ \text{ de macrófagos a t21}}$$

2.8.3 Análisis estadístico

Los ensayos de internalización y supervivencia intracelular se realizaron al menos tres veces en triplicado por cada cepa estudiada. Los análisis estadísticos de estos ensayos se realizaron con el *software* GraphPad Prism 5.0, utilizando el test estadístico *t* de Student para comparar las diferencias entre los valores obtenidos para cada cepa mutante con los valores obtenidos para la cepa silvestre.

2.9 Ensayos de expresión y translocación del componente VgrG al interior de macrófagos RAW26.7

2.9.1 Ensayo de expresión intracelular

Previo al ensayo, las cepas a utilizar se transformaron con el plasmidio pmCherry (Tabla 2) de tal manera que se pueden observar las bacterias debido a la emisión de fluorescencia roja.

Para los ensayos de expresión intracelular se utilizaron macrófagos RAW 264.7 crecidos a una confluencia de ~70% sobre cubreobjetos de 25 mm de diámetro en placas de 6 pocillos. Se infectaron los macrófagos con las cepas con las fusiones al reportero *gfp* (Tabla 1, cepas *S. Dublin ssaG-gfp_{td}*, *S. Dublin SPI-6 vgrG-gfp_{td}*, *S. Dublin SPI-6 vgrG-gfp_{ts}*, *S. Dublin SPI-19 vgrG-gfp_{td}* y *S. Dublin SPI-19 vgrG-gfp_{ts}*). El ensayo se realizó como se describió en la Sección 2.8.2. Luego de 1 o 21 hrs post-infección, las células se fijaron sobre los cubreobjetos utilizando formaldehído al 4%. Se tomaron los cubreobjetos donde se encontraban adheridos los macrófagos y se montaron sobre un portaobjetos utilizando medio de montaje para microscopía con DAPI. Las muestras fijadas se analizaron mediante microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio Spinning Disk Olympus IX 81. Se obtuvieron imágenes de distintos campos observados utilizando una cámara Zeiss AxioCam MRC5 y software CellR.

2.9.2 Ensayo de translocación citoplasmática

Para determinar la secreción de VgrG al interior de macrófagos, se clonó el marco de lectura de *vgrG* de SPI-6 en el vector pFlagTEM (Sección 2.7). Esto permite generar una fusión traduccional de VgrG al epitope 3xFLAG, seguido del gen reportero de la β -lactamasa TEM-1. Mediante esta fusión podemos analizar la translocación de VgrG junto con el reportero TEM-1.

En el caso de *vgrG* codificado en SPI-19, se utilizó un plasmidio construido con anterioridad en el cual se encuentra clonado el marco de lectura de *vgrG* codificado en SPI-19 de *Salmonella enterica* serovar Gallinarum, el cual posee un 99% de identidad de secuencia con su homólogo en *S. Dublin*.

Para los ensayos de translocación se utilizaron macrófagos RAW 264.7 crecidos a una confluencia de ~70% en placas de 48 pocillos. El ensayo se realizó como se describió en la sección 2.8.2. Se infectaron los macrófagos con las cepas con el plasmidio reportero respectivo (Tabla 1, cepas de *S. Dublin* pFT, pSipAFT, pVgrGFT_{SPI-6}, pVgrGFT_{SPI-19} y $\Delta c/pV_{SPI-6}$ pVgrGFT_{SPI-6}) crecidas por 3 h en anaerobiosis en LB suplementado con Cam e IPTG (0,5 mM). Luego de 1 o 21 h post-infección, se incubaron las células con el sustrato fluorescente CCF2-AM durante 1,5 a 2 h. Las muestras se analizaron mediante microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio Spinning Disk Olympus IX 81. Se obtuvieron imágenes de distintos campos observados utilizando una cámara Zeiss Axiocam MRC5 y software CellR.

3. RESULTADOS

3.1. Los T6SS codificados en las islas genómicas SPI-6 y SPI-19 de *S. Dublin* se expresan al interior de macrófagos murinos

3.1.1. Construcción de fusiones traduccionales y transcripcionales de *vgrG* al reportero GFP

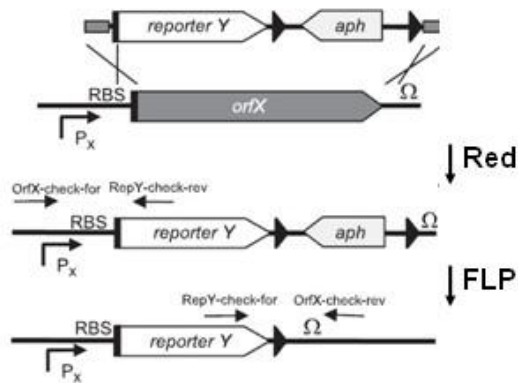
Un análisis bioinformático realizado previamente en nuestro laboratorio detectó dos posibles Sistemas de Secreción Tipo VI codificados en dos regiones del genoma de *S. Dublin* con características de islas genómicas [11]. Estas islas se denominaron SPI-6, descrita anteriormente en *S. Typhimurium* [30] y SPI-19, que no había sido reportada.

En esta Tesis se investigó en primer lugar si cada uno de estos sistemas de secreción se expresan al interior de macrófagos RAW 264.7. Con este objetivo, se construyeron fusiones transcripcionales y traduccionales del componente VgrG codificado en cada isla al gen que codifica la proteína fluorescente verde GFP.

Para obtener las fusiones, se insertó el marco de lectura abierto (ORF) del gen *gfp*, en cada gen *vgrG* por separado. Para esto, a partir del plasmidio pLZ01 se amplificó por PCR el gen *gfp* junto con un *cassette* de resistencia a Cam utilizando partidores que poseían en sus extremos regiones idénticas a los extremos de la región de *vgrG* a mutagenizar. El producto de PCR obtenido en cada caso se introdujo por transformación en *S. Dublin* CT_02021853 transformada con el plasmidio pKD46, que codifica el sistema recombinasa Red del bacteriófago λ . Este sistema cataliza el proceso de recombinación homóloga que permite el reemplazo de *vgrG* por el producto de PCR.

En la **Figura 4** se muestra un esquema de la construcción de una fusión transcripcional, en la cual el producto de PCR reemplaza al ORF de interés (**Figura 4a**) y de una fusión traduccional, en la cual el producto de PCR recombina con una secuencia interna del ORF de interés eliminando el codón de término e insertando el ORF del gen reportero a continuación y en el mismo marco de lectura (**Figura 4b**).

a) Fusiones transcripcionales



b) Fusiones traduccionales

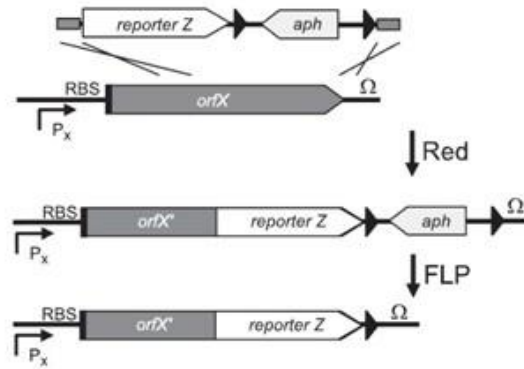


Figura 4. Esquema de la generación de fusiones transcripcionales y traduccionales a un gen reportero. Los amplicones son generados utilizando como template un plasmidio que codifica un gen reportero (reportero Y o Z) vecino a un gen de resistencia a antibiótico (*aph*) y utilizando partidores que poseen en sus extremos secuencias homólogas al gen blanco. En presencia del sistema λ Red se produce la integración del reportero y el gen de resistencia: a) reemplazando el ORF del gen de interés (*orfX*) y generando una fusión transcripcional bajo el control del promotor del gen silvestre, b) eliminando el codón de término del ORF de interés e insertando el reportero a continuación y en el mismo marco de lectura. Luego de producida la integración cromosómica del reportero, el gen de resistencia a antibiótico puede ser eliminado utilizando el sistema de recombinación FLP-FRT. **Adaptado de Gerlach y cols, 2007 [45].**

Las fusiones así construidas se seleccionaron por su resistencia a Cam y, posteriormente, se purificaron clones aislados para confirmar la inserción del reportero en *vgrG* mediante PCR utilizando un partidor interno al producto insertado y uno adyacente al extremo 3' de *vgrG*. La **Figura 5** muestra un resultado representativo de este análisis, realizado con fusiones transcripcionales y traduccionales del reportero *gfp* al gen *vgrG* codificado en la isla SPI-6. Se observa la amplificación del producto esperado de 169 pb en los cuatro clones analizados.

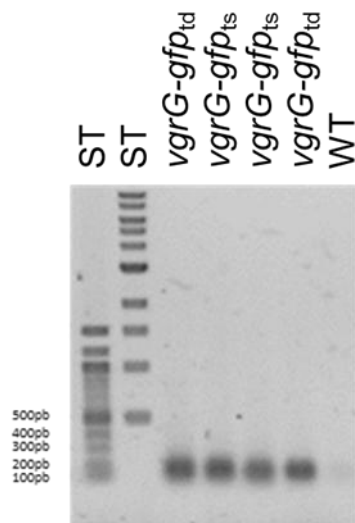


Figura 5. Comprobación de la correcta construcción de fusiones transcripcionales y traduccionales a GFP del gen *vgrG* codificado en SPI-6. La figura muestra los productos de amplificación analizados en un gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio. Se utilizó DNA de la cepa *S. Dublin* CT_02021853 (WT) como control. Tamaño esperado del amplicón: 169 pb. ST, Estándar de peso molecular.

3.1.2 Los T6SS codificados en SPI-6 y SPI-19 de *S. Dublin* se expresan al interior de macrófagos murinos

Para analizar la expresión de las fusiones al interior de macrófagos murinos, las cepas que contenían las fusiones transcripcionales y traduccionales fueron previamente transformadas con el plasmidio pmCherry, el cual permite la expresión constitutiva de la proteína fluorescente roja mCherry.

Previo a realizar los experimentos de expresión de los genes *vgrG* de ambos T6SS al interior de macrófagos, se determinó si éstos se expresaban en condiciones de cultivo celular, pero en ausencia de macrófagos. Para esto, las bacterias se cultivaron en medio DMEM suplementado con 8% SFB y se observaron al microscopio de epifluorescencia. Como se puede observar en la **Figura 6**, tanto las bacterias que contenían las fusiones transcripcionales como traduccionales de los genes *vgrG* contenidos en ambas islas (SPI-6 y SPI-19) presentaron fluorescencia roja. Por otra parte, no se detectaron bacterias que presentaran fluorescencia verde, lo que sugiere que la expresión de los T6SS en estudio se encuentra reprimida en condiciones de cultivo *in vitro* como se ha observado previamente en nuestro laboratorio con el T6SS de *S. Gallinarum* [39].

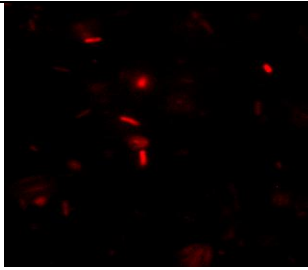

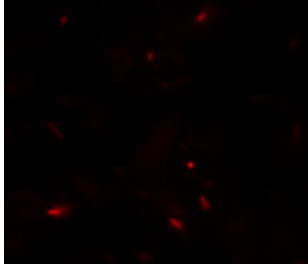
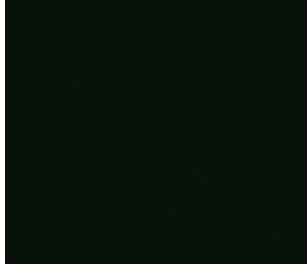
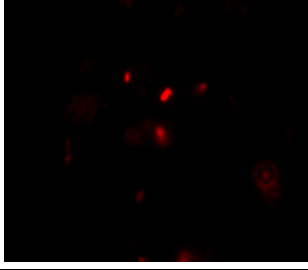
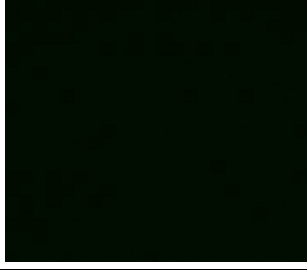
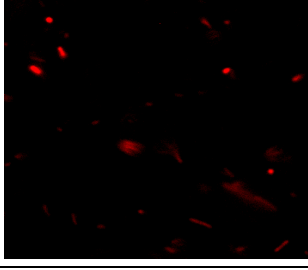
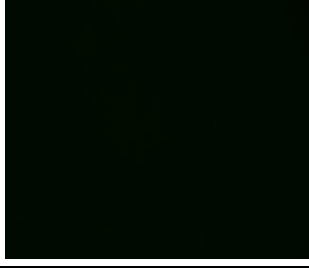
	mCHERRY	GFP
SPI-6 <i>vgrG-gfp_{td}</i>		
SPI-6 <i>vgrG-gfp_{ts}</i>		
SPI-19 <i>vgrG-gfp_{td}</i>		
SPI-19 <i>vgrG-gfp_{ts}</i>		

Figura 6. Análisis de la expresión de las fusiones traduccionales y transcripcionales de *vgrG* al gen reportero *gfp* en medio DMEM. Se evaluó la expresión de los T6SS codificados en SPI-6 (SPI-6 *vgrG-gfp_{ts}* o *td*) y SPI-19 (SPI-19 *vgrG-gfp_{ts}* o *td*) mediante fusiones traduccionales (*td*) y transcripcionales (*ts*) de *vgrG* al reportero *gfp*. Se muestra la emisión de fluorescencia para los canales rojo (mCherry) y verde (GFP).

Para determinar la expresión de *vgrG* al interior de macrófagos murinos, éstos fueron infectados con las bacterias que contenían cada una de las fusiones construidas y se evaluó la emisión de fluorescencia verde y roja luego de 1 y 21 h post-infección. Como control positivo se utilizó una fusión traduccional de *gfp* a *ssaG* (*ssaG-gfp_{td}*). *SsaG* corresponde a un componente estructural del T3SS codificado en SPI-2 que se expresa preferentemente luego que *Salmonella* ingresa a las células hospederas [46].

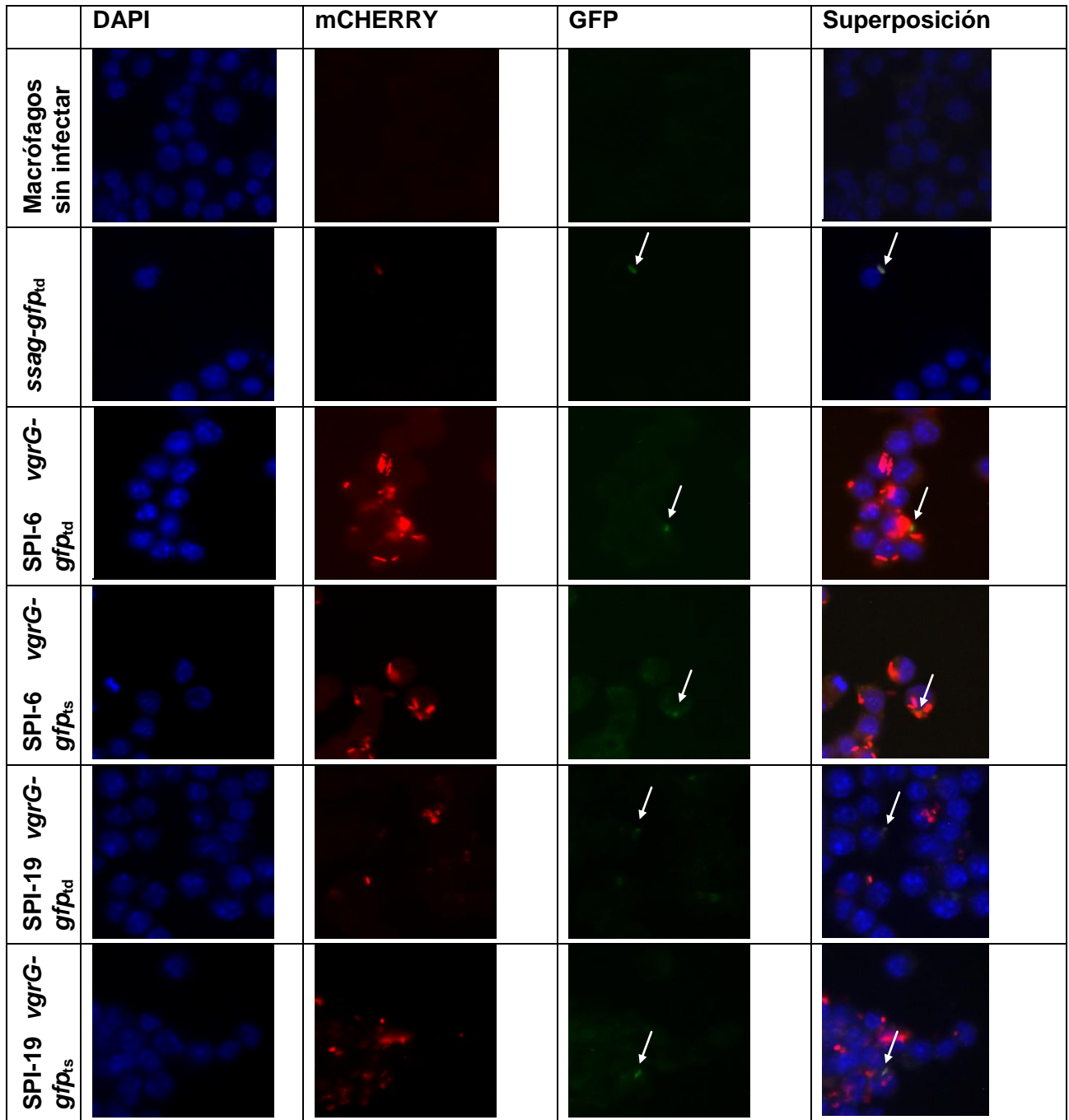


Figura 7. Expresión de las fusiones traduccionales y transcripcionales de *vgrG* al reportero *gfp 1* hora post-infección de macrófagos murinos. Se muestra la emisión de fluorescencia para los canales azul (DAPI), rojo (mCherry), verde (GFP) y la superposición de los tres. Se utilizó una fusión traduccional *ssaG-gfp_{td}* como control positivo de expresión dentro de macrófagos. Se señala con una flecha blanca las bacterias que presentan fluorescencia verde. Fotos representativas de un mínimo de 3 campos observados para cada fusión.

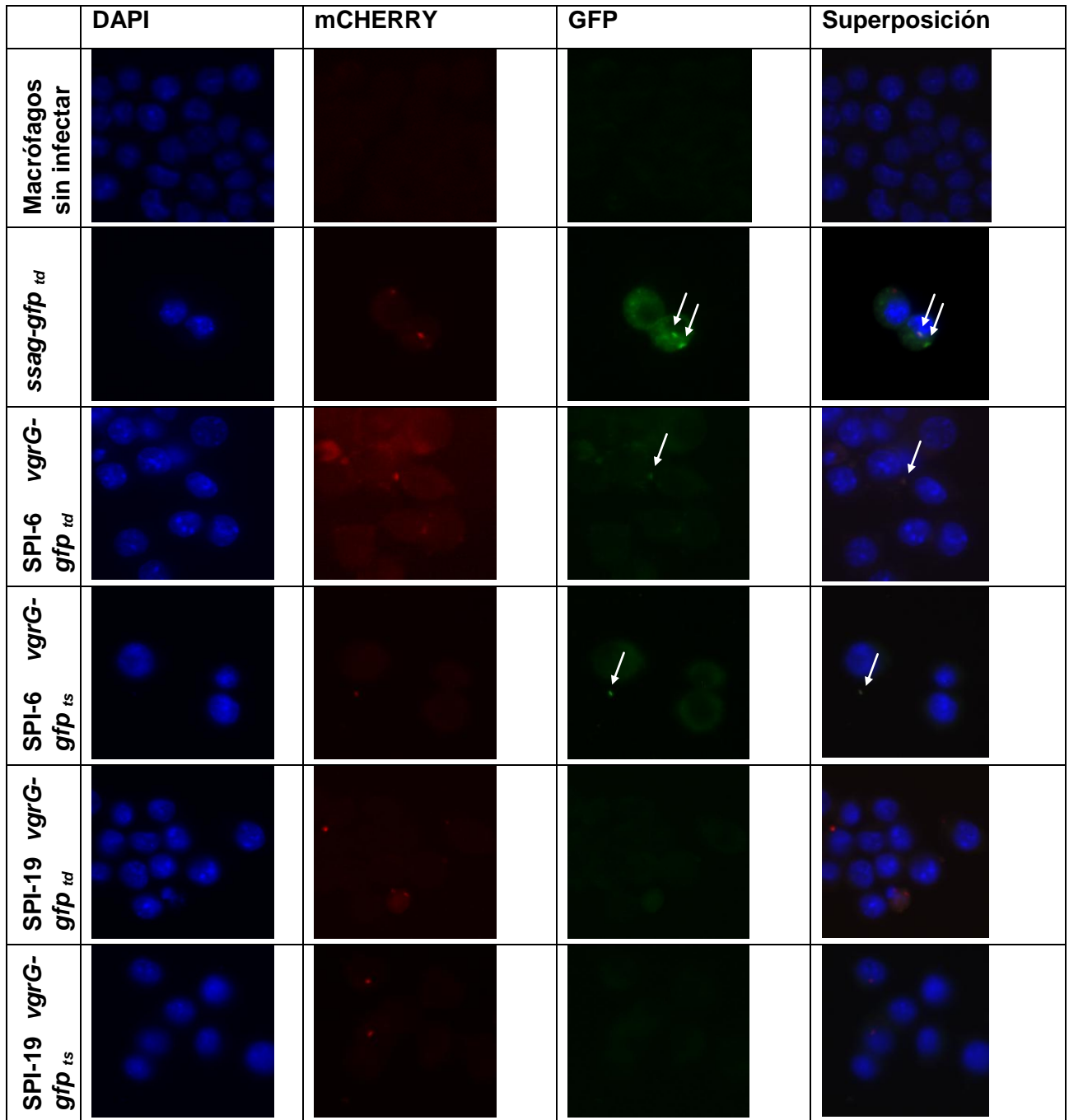


Figura 8. Expresión de las fusiones traduccionales y transcripcionales de *vgrG* al reportero *gfp* 21 horas post-infección de macrófagos murinos. Se muestra la emisión de fluorescencia para los canales azul (DAPI), rojo (mCherry), verde (GFP) y la superposición de los tres. Se utilizó una fusión *ssaG-gfp^{td}* como control positivo de expresión dentro de macrófagos. Se señala con una flecha blanca las bacterias que presentan fluorescencia verde. Fotos representativas de un mínimo de 3 campos observados para cada fusión.

Luego de 1 h post-infección, se observó la expresión de ambas *vgrG* a nivel transcripcional y traduccional al interior de macrófagos murinos (**Figura 7**), aunque cabe destacar que las bacterias verdes corresponden a una pequeña fracción de entre toda la población de bacterias rojas. Como era de esperarse, la fusión *ssaG-gfp_{td}* también se expresa al interior de macrófagos (**Figura 7**).

Luego de 21 h post-infección sólo se observa la expresión de VgrG codificada en SPI-6 al interior de macrófagos murinos, no así la expresión de VgrG codificada SPI-19 (**Figura 8**). La vida media de GFP en *E. coli* se ha determinado de alrededor de 24 h. Debido a esta gran estabilidad es posible que la fluorescencia observada 21 h post-infección se deba a la proteína producida 1 h post-infección [47]. Por otra parte, es posible que la ausencia de fluorescencia en el caso de VgrG codificada en SPI-19 a las 21 horas post-infección se deba a la degradación de las bacterias que expresaron GFP por parte del macrófago o a que la proliferación de estas bacterias diluyera la concentración de GFP en su interior de tal manera que no es posible detectar la fluorescencia mediante el método empleado.

Al ser VgrG un componente estructural esencial para el funcionamiento de los T6SS, estos resultados indican que los T6SS codificados en SPI-6 y SPI-19 se expresan preferencialmente al interior de macrófagos murinos en cultivo, sugiriendo que estos T6SS podrían cumplir un papel en la interacción de *S. Dublin* con las células fagocíticas.

3.2 Analisis de translocación citoplasmática de VgrG

Luego de comprobar que los T6SS codificados en SPI-6 y SPI-19 se expresan al interior de macrófagos murinos, se evaluó la funcionalidad de estos sistemas. Con este objetivo, se ensayó la capacidad de *S. Dublin* de translocar la proteína VgrG al citoplasma de macrófagos murinos RAW 264.7. La secreción de VgrG es un claro indicio de un T6SS funcional [18].

3.2.1 Construcción de la fusión de VgrG al reportero TEM-1 para el análisis de translocación de VgrG

Para determinar translocación de VgrG codificado en SPI-6 de *S. Dublin* se clonó el correspondiente marco de lectura de *vgrG* en el vector pFlagTEM, el cual permite generar una fusión génica de *vgrG* al epítotope 3xFLAG seguido del gen reportero de la β -lactamasa TEM-1. Por su parte, para estudiar la translocación de VgrG codificado en SPI-19 se

transformó la cepa *S. Dublin* CT_02021853 con el plasmidio pVgrGFT_{SPI-19}. Este plasmidio, construido en nuestro laboratorio, posee el marco de lectura de *vgrG*_{SPI-19} de *S. Gallinarum* clonado en el plasmidio pFlagTEM. En esta Tesis se utilizó esta construcción debido al alto grado de identidad (~99%) entre los genes *vgrG* de las islas SPI-19 de *S. Gallinarum* y *S. Dublin*. La expresión de la proteína de fusión está regulada por el promotor *trc*, lo que permite inducir su expresión con IPTG e inhibir su expresión con glucosa. Mediante esta fusión se puede analizar la translocación del VgrG junto con el reportero TEM-1 [41]. Esta técnica utiliza las propiedades del sustrato CCF2/AM, el cual emite fluorescencia a 520 nm cuando es excitado a una longitud de onda de 405 nm luego de ingresar al citoplasma de las células eucariontes. Cuando este sustrato es degradado por una β -lactamasa, su emisión cambia a 447 nm, indicando que existe una translocación de la proteína de fusión hacia el citoplasma (**Figura 9**).

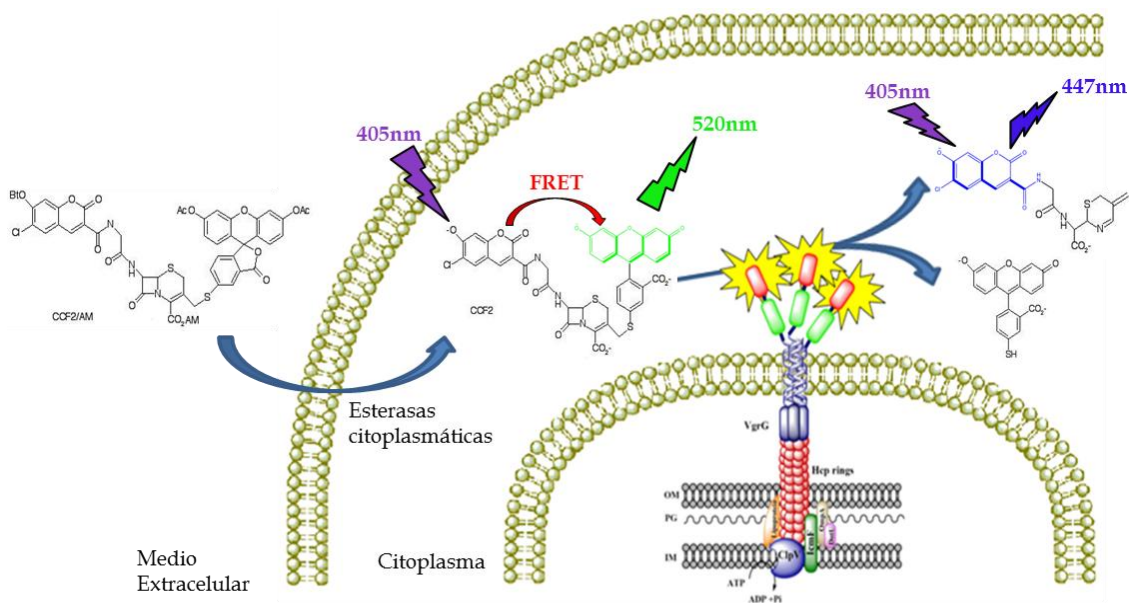


Figura 9. Esquema del ensayo de translocación de la proteína VgrG al citoplasma de macrófagos RAW 264.7. El derivado acetometoxy-CCF2 (CCF2/AM) es capaz de atravesar la membrana celular. Una vez dentro de la célula, es procesado por esterasas citoplasmáticas, liberándose el sustrato fluorescente CCF2. Éste posee dos grupos fluorescentes unidos por un anillo β -lactámico, entre los cuales se transfiere energía por un efecto de FRET, de tal manera que la absorción de luz a una longitud de onda de 405 nm genera la emisión de fluorescencia a 520 nm (verde). Si la proteína de fusión VgrG-FlagTEM es translocada al citoplasma del macrófago, se cortará el anillo β -lactámico que une a ambos grupos fluorescentes. En este caso, la absorción de luz a 405 nm genera una emisión a 447 nm (azul). De esta forma, la emisión de fluorescencia a 447 nm es un indicador de la presencia de moléculas de β -lactamasa translocadas por la bacteria hacia el citoplasma de la célula.

El clonamiento del ORF de *vgrG* codificado en SPI-6 en el vector plasmidio pFlagTEM se realizó como se esquematiza en la **Figura 10**. El plasmidio resultante (pVgrGFT_{SPI-6}) se introdujo en la cepa *E. coli* DH5α.

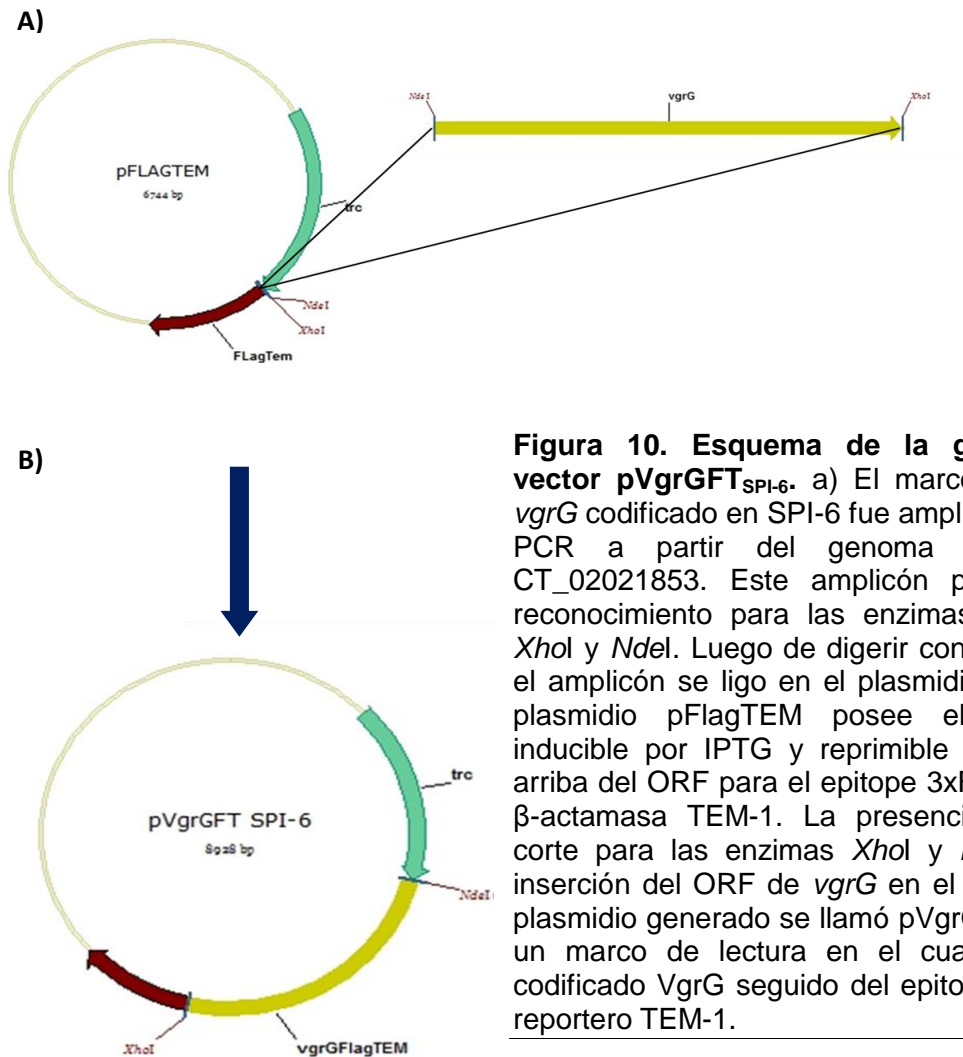


Figura 10. Esquema de la generación del vector pVgrGFT_{SPI-6}. a) El marco de lectura de *vgrG* codificado en SPI-6 fue amplificado mediante PCR a partir del genoma de *S. Dublin* CT_02021853. Este amplicón posee sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *XhoI* y *NdeI*. Luego de digerir con estas enzimas, el amplicón se ligo en el plasmidio pFlagTEM. El plasmidio pFlagTEM posee el promotor *trc* inducible por IPTG y reprimible por glucosa río arriba del ORF para el epítopo 3xFLAG unido a la β-actamasa TEM-1. La presencia de sitios de corte para las enzimas *XhoI* y *NdeI* permite la inserción del ORF de *vgrG* en el plasmidio. b) El plasmidio generado se llamó pVgrGFT_{SPI-6} y posee un marco de lectura en el cual se encuentra codificado VgrG seguido del epítopo 3xFLAG y el reportero TEM-1.

La correcta inserción del ORF de *vgrG* en el plasmidio pFlagTEM se comprobó mediante PCR utilizando un partidor interno de *vgrG* y un partidor que flanquea el sitio de inserción de *vgrG* (**Figura 11a**) o utilizando partidores que flanquean el sitio donde se insertó *vgrG* en el plasmidio (**Figura 11b**). También se comprobó la expresión de la proteína de fusión

VgrG-FlagTEM_{SPI-6} mediante Western blot utilizando un anticuerpo contra el epítopo Flag. Se puede observar la producción de la proteína FlagTEM (FT) y la proteína de fusión VgrG-FlagTEM_{SPI-6} (VgrGFT) en condición inductora con IPTG y, en menor cantidad, en condición de represión con glucosa (**Figura 11c**). Luego de comprobado el clonamiento, se transformó la cepa *S. Dublin* CT_02021853 con el plásmido pVgrGFT_{SPI-6}.

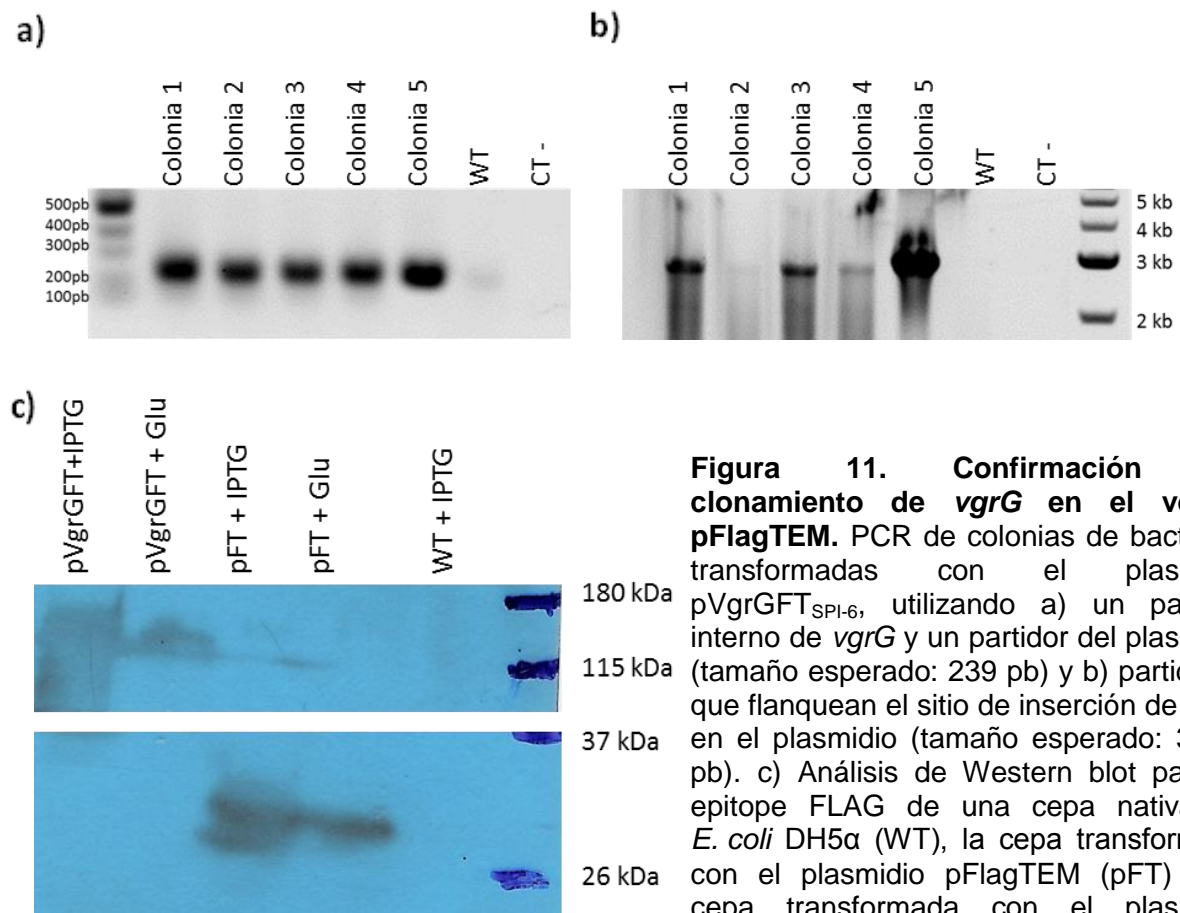


Figura 11. Confirmación del clonamiento de *vgrG* en el vector pFlagTEM. PCR de colonias de bacterias transformadas con el plásmido pVgrGFT_{SPI-6}, utilizando a) un partidor interno de *vgrG* y un partidor del plásmido (tamaño esperado: 239 pb) y b) partidores que flanquean el sitio de inserción de *vgrG* en el plásmido (tamaño esperado: 3.054 pb). c) Análisis de Western blot para el epítopo FLAG de una cepa nativa de *E. coli* DH5 α (WT), la cepa transformada con el plásmido pFlagTEM (pFT) y la cepa transformada con el plásmido pVgrGFT_{SPI-6} (pVgrGFT) en condiciones de inducción (+ IPTG) o represión (+ Glu) de la expresión. Tamaño esperado para pVgrGFT_{SPI-6} ~132 kDa y para pFT ~32 kDa.

3.2.2 Análisis de la funcionalidad de los T6SS codificados en S. Dublin en macrófagos murinos mediante microscopía de fluorescencia

Para detectar la translocación del componente VgrG de cada isla, SPI-6 y SPI-19, los macrófagos RAW 264.7 se infectaron con las cepas de S. Dublin que contenían los plasmidios pVgrGFT_{SPI-6} y pVgrGFT_{SPI-19}. Luego de 1 o 21 hrs post infección, las células se incubaron con el sustrato fluorescente CCF2/AM durante 1,5 a 2 h y posteriormente se observaron mediante microscopía de fluorescencia.

Como control positivo se utilizó el marco de lectura de *sipA* de S. Typhimurium en plasmidio pFlagTEM (pSipAFT). SipA es una proteína efectora translocada por *Salmonella* al citoplasma de la célula hospedera mediante el T3SS codificado en SPI-1 [41]. Una mutante con una delección de la isla SPI-1 transformada con pSipAFT y la cepa silvestre de S. Dublin transformada con el vector pFlagTEM vacío se utilizaron como controles negativos.

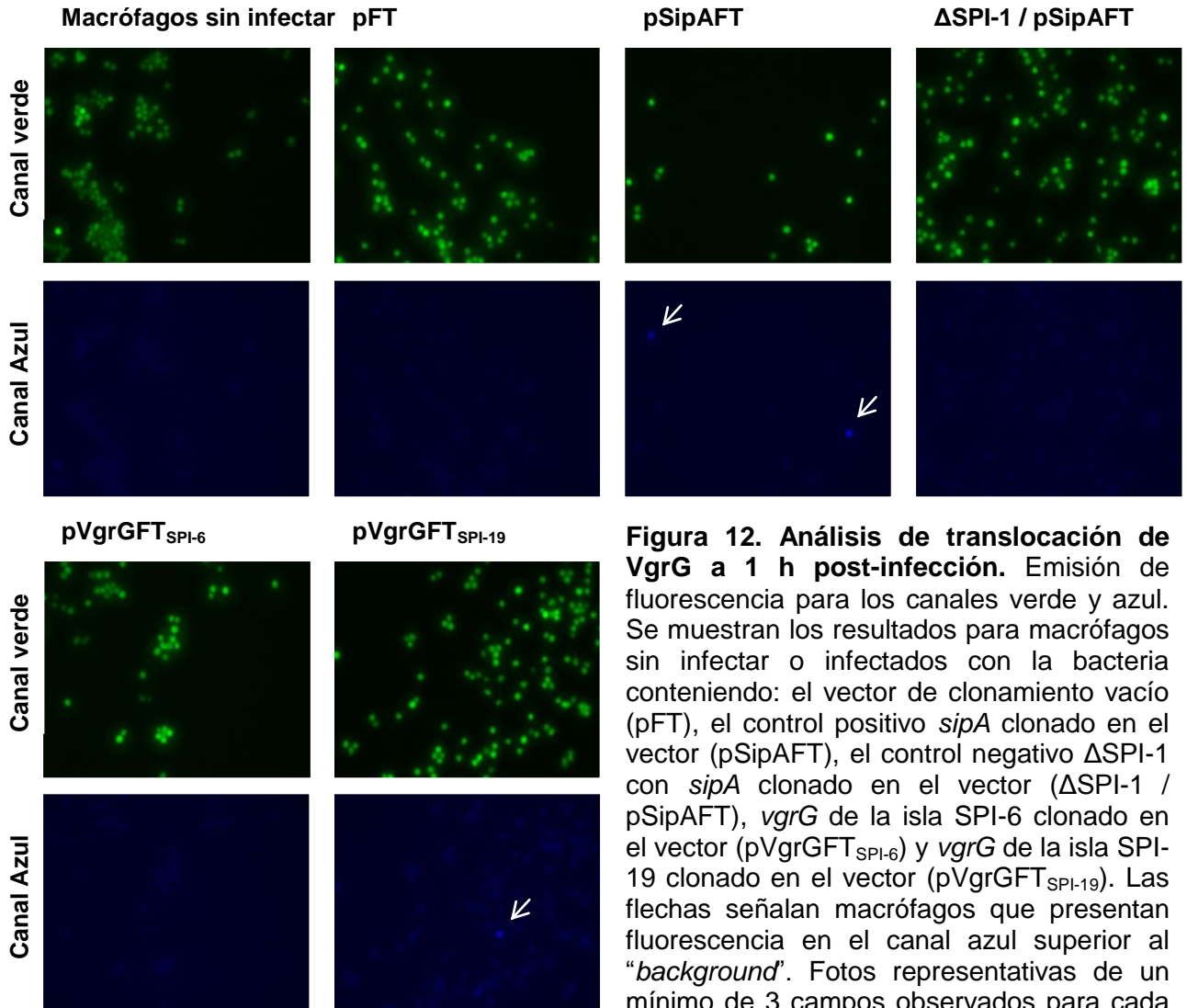


Figura 12. Análisis de translocación de VgrG a 1 h post-infección. Emisión de fluorescencia para los canales verde y azul. Se muestran los resultados para macrófagos sin infectar o infectados con la bacteria conteniendo: el vector de clonamiento vacío (pFT), el control positivo *sipA* clonado en el vector (pSipAFT), el control negativo Δ SPI-1 con *sipA* clonado en el vector (Δ SPI-1 / pSipAFT), *vgrG* de la isla SPI-6 clonado en el vector (pVgrGFT_{SPI-6}) y *vgrG* de la isla SPI-19 clonado en el vector (pVgrGFT_{SPI-19}). Las flechas señalan macrófagos que presentan fluorescencia en el canal azul superior al “background”. Fotos representativas de un mínimo de 3 campos observados para cada condición.

Se puede observar que a 1 h post-infección (**Figura 12**) ocurre translocación de las proteínas VgrG_{SPI-19} y SipA. Es importante hacer notar que la translocación de VgrG_{SPI-19} es un evento que se visualiza muy escasamente. Por otra parte, no se observó translocación de VgrG_{SPI-6}. Tanto en el caso de la cepa con el vector vacío como en la cepa mutante de SPI-1 transformada con el plasmidio pSipAFT no se observaron eventos de translocación.

En contraste a lo observado a 1 h post-infección, el análisis de translocación a 21 h post-infección (**Figura 13**) reveló que tanto VgrG_{SPI-6} como SipA son translocadas hacia el

citoplasma del macrófago. Por otra parte, no fue posible observar la translocación de VgrG_{SPI-19}. La frecuencia de eventos de translocación visualizados para VgrG_{SPI-6} después de 21 h es mayor a la observada para VgrG_{SPI-19} luego de 1 h, visualizándose en cada campo por lo menos un evento de translocación. Además, se determinó que la translocación de VgrG_{SPI-6} es dependiente de ClpV_{SPI-6}, ya que la mutante $\Delta clpV_{SPI-6}$ es incapaz de translocar la proteína hacia el citoplasma del macrófago (**Figura 13**).

Estos resultados sugieren que los T6SS codificados en SPI-6 y SPI-19 son funcionales, siendo capaces de translocar VgrG hacia el macrófago. Además, responden a distintas señales temporales. Estos datos respaldan las observaciones de los experimentos de expresión, correlacionándose la expresión temprana de VgrG_{SPI-19} con la translocación temprana de ésta y la expresión tardía de VgrG_{SPI-6} con su translocación a tiempos tardíos durante la infección.

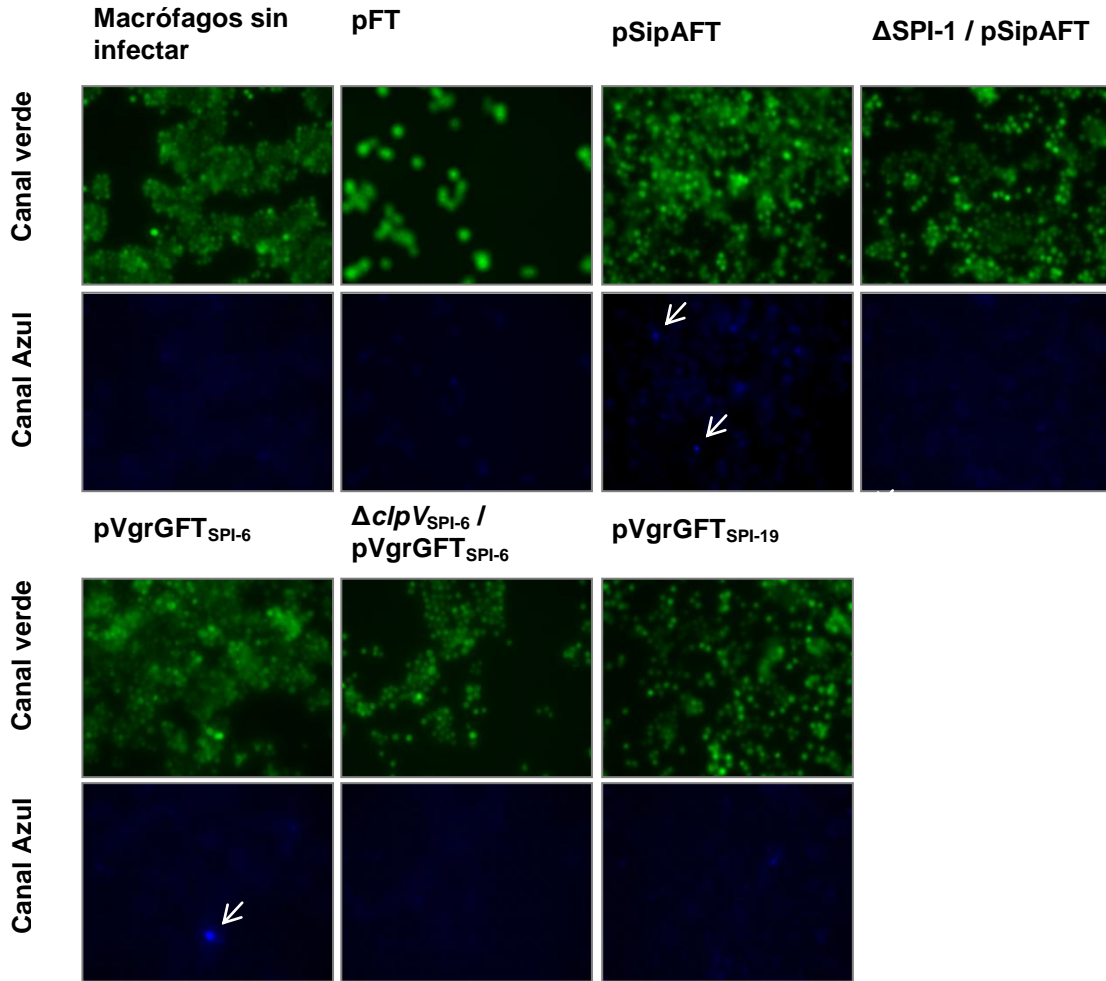


Figura 13. Análisis de translocación a 21 h post-infección. Emisión de fluorescencia para los canales verde y azul. Se muestran los resultados para macrófagos sin infectar o infectados con la bacteria conteniendo: el vector de clonamiento vacío (pFT), el control positivo *sipA* clonado en el vector (pSipAFT), el control negativo Δ SPI-1 con *sipA* clonado en el vector (Δ SPI-1 / pSipAFT), *vgrG* de la isla SPI-6 clonado en el vector (pVgrGFT_{SPI-6}), mutante de *clpV* de SPI-6 con *vgrG* de la isla SPI-6 clonado en el vector (Δ clpV_{SPI-6} / pVgrGFT_{SPI-6}) y *vgrG* de la isla SPI-19 clonado en el vector (pVgrGFT_{SPI-19}). Las flechas señalan macrófagos que presentan fluorescencia en el canal azul superior al “background”. Fotos representativas de un mínimo de 3 campos observados para cada condición

3.3 Los T6SS codificados en el genoma de *S. Dublin* no son necesarios para el ingreso o supervivencia de la bacteria al interior de macrófagos

3.3.1 Generación de mutantes

Para estudiar si los T6SS codificados en SPI-6 y SPI-19 participan en la internalización y supervivencia de *S. Dublin* en macrófagos murinos, se utilizaron cepas mutantes de cada

sistema de secreción, una cepa doble mutante carente de ambos sistemas de secreción y las correspondientes mutantes en los genes *clpV*. Las mutantes se generaron utilizando la metodología descrita por Datsenko y Wanner [40], que consiste en el reemplazo del gen o la región genómica de interés por un *cassette* de resistencia a antibiótico mediada por la recombinasa Red del fago lambda codificada en el plasmidio pKD46. El *cassette* de resistencia a antibiótico está contenido en un producto de PCR que presenta en sus extremos secuencias que flanquean al gen o la región genómica de interés. Una vez realizado el reemplazo alélico, el gen de resistencia puede ser escindido por recombinación sitio específica mediada por la recombinasa Fip codificada en el plasmidio pCP20. En la **Figura 14a** se muestra un esquema del método de mutagénesis.

Utilizando esta metodología, se obtuvieron mutantes en el gen *clpV*_{SPI-19}. Las mutantes se seleccionaron por su resistencia a Kan. Posteriormente, se purificaron clones aislados para confirmar la presencia de la mutación mediante PCR, utilizando un partidor interno del producto insertado y uno adyacente al extremo 3' de *clpV*. La **Figura 14b** muestra el análisis en un gel de agarosa de uno de estos clones. La mutante las islas y de *clpV*_{SPI-6} se encontraban disponibles con anterioridad al desarrollo de esta tesis (Tabla 1).

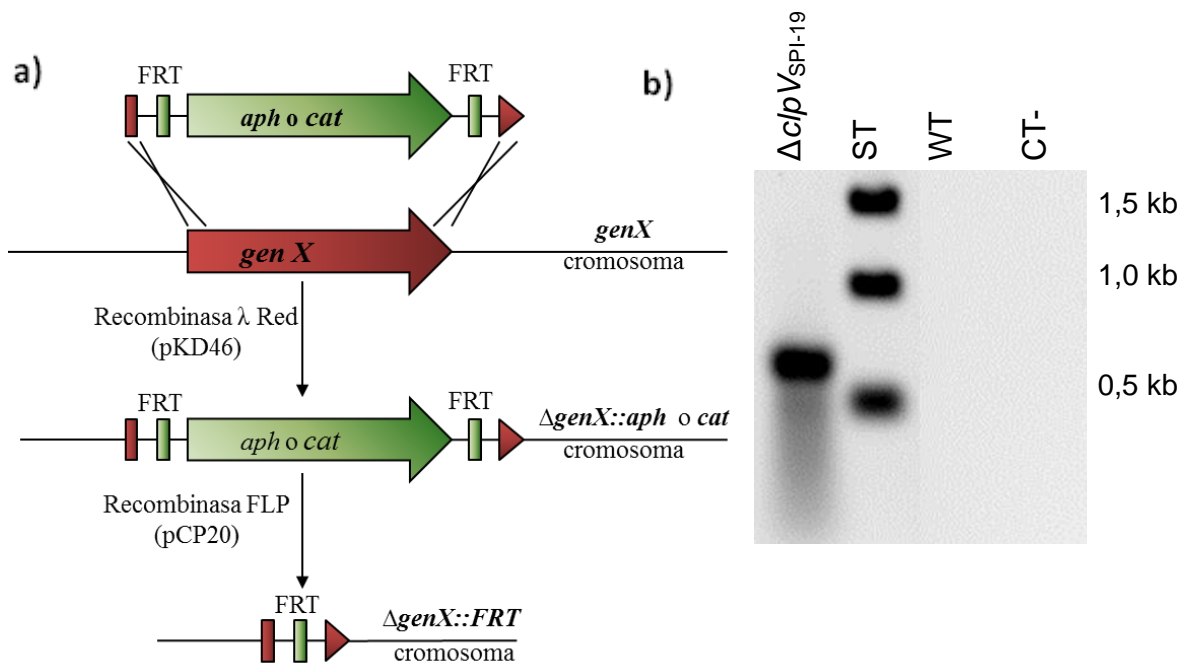


Figura 14. Generación de mutantes mediante reemplazo alélico por recombinación de un producto de PCR. a) Esquema ilustrativo de la generación de mutantes: el producto de PCR obtenido posee extremos idénticos al gen o región genómica a mutar (*genX*). Mediante la expresión del sistema λ Red codificado en el plasmidio pKD46 este producto recombina con el genoma de la bacteria eliminando la región a mutar y reemplazándola por un *cassette* de resistencia a antibiótico. Éste es eliminado posteriormente mediante la recombinasa Flp codificada en el plasmidio pCP20. b) Mediante PCR de colonias se comprobó la inserción del producto de PCR para la mutación de *c/pV_{SPI-19}* ($\Delta c/pV_{SPI-19}$). Se utilizó la cepa *S. Dublin* CT_02021853 (WT) y una reacción de PCR sin bacteria (CT-) como controles negativos. Para la comprobación de la mutagénesis se utilizó un partidor que aparee con el *cassette* de resistencia y un partidor que aparee con la secuencia flanqueante al gen. Tamaño esperado del amplicón: 550 pb. ST, Estándar de peso molecular.

3.3.2 Las mutantes carentes de los T6SS no presentan deficiencias de internalización y supervivencia intracelular en macrófagos

Mediante ensayos de protección a gentamicina se estudió la contribución de los T6SS codificados en SPI-6 y SPI-19 a la capacidad de la bacteria para ingresar y sobrevivir al

interior de macrófagos murinos *in vitro*. Para esto, se comparó la cepa silvestre con mutantes en los T6SS y las respectivas mutantes en los genes *clpV*. Se utilizó como control una cepa mutante en el gen *aroA* ($\Delta aroA$), ya que esta mutante es atenuada en la supervivencia intracelular en macrófagos [48].

Los resultados no mostraron diferencias significativas entre la cepa silvestre y las mutantes de los T6SS en la capacidad de internalización a 1 h post-infección (**Figura 15a**), como tampoco en la supervivencia intracelular en macrófagos murinos luego de 21 h de infección (**Figura 15b**).

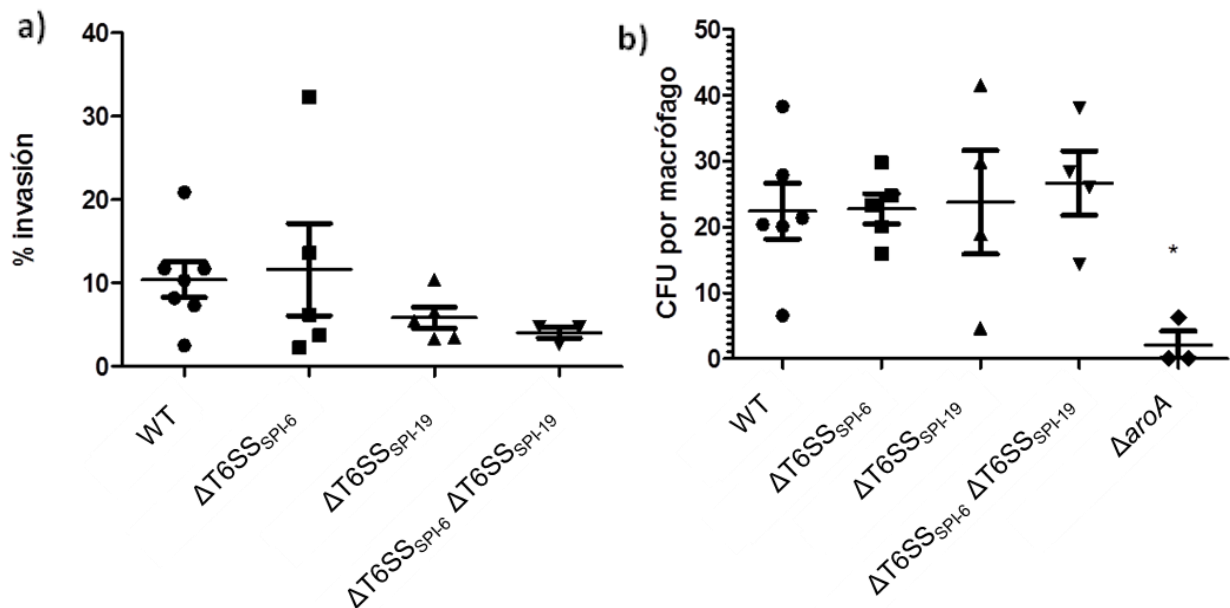


Figura 15. Internalización y supervivencia intracelular de mutantes en los T6SS codificados en las islas SPI-6 y SPI-19 de *S. Dublin*. Se muestran los resultados de a) internalización y b) supervivencia intracelular en macrófagos RAW 264.7 por la cepa silvestre de *S. Dublin* (WT) y las mutantes de los T6SS codificados en SPI-6 ($\Delta T6SS_{SPI-6}$), SPI-19 ($\Delta T6SS_{SPI-19}$), la mutante en ambos sistemas ($\Delta T6SS_{SPI-6 SPI-19}$) y la mutante *aroA* ($\Delta aroA$). Cada punto corresponde al promedio de un experimento. Se presenta el promedio \pm la desviación estándar.

* $p < 0,05$ en comparación con la cepa silvestre.

Se obtuvieron resultados similares con las mutantes en los genes *clpV*; no se observaron diferencias significativas respecto a la cepa silvestre (**Figura 16**).

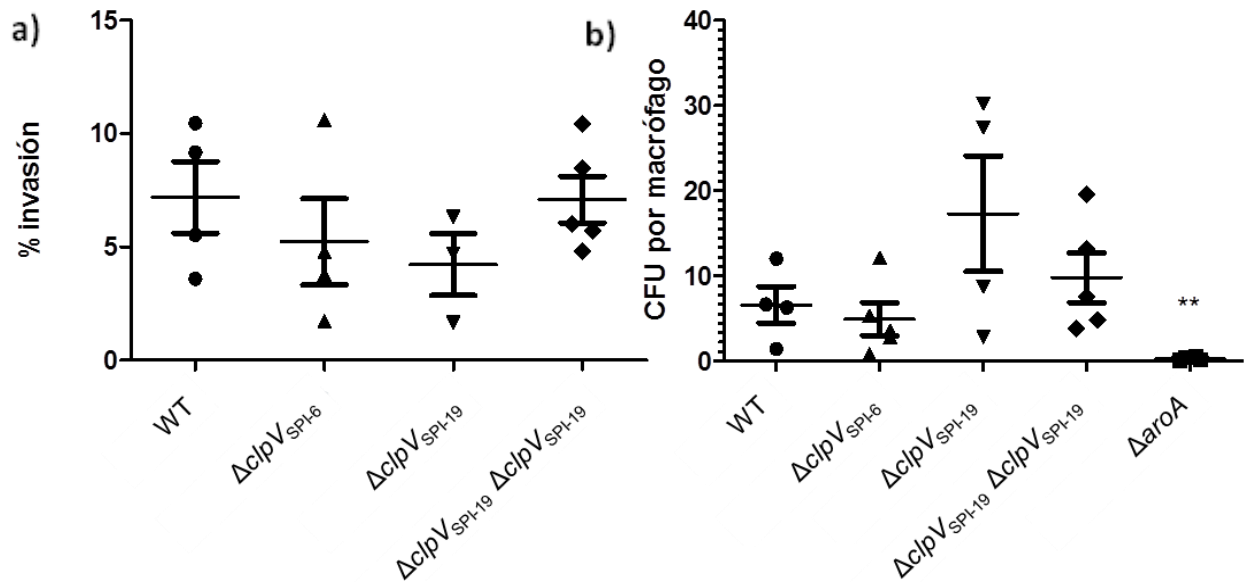


Figura 16. Internalización y supervivencia intracelular de mutantes en el gene *clpV* de los T6SS codificados en las islas SPI-6 y SPI-19 de *S. Dublin*. Se muestran los resultados de a) internalización y b) supervivencia intracelular en macrófagos RAW 264.7 por la cepa silvestre de *S. Dublin* (WT) y las mutantes en el gen *clpV* de los T6SS codificados en SPI-6 ($\Delta clpV_{SPI-6}$), SPI-19 ($\Delta clpV_{SPI-19}$), la mutante de ambos genes ($\Delta clpV_{SPI-6} \Delta clpV_{SPI-19}$) y la mutante *aroA* ($\Delta aroA$). Cada punto corresponde al promedio de un experimento. Se presenta el promedio \pm la desviación estándar.

** $p < 0,01$ en comparación con la cepa silvestre.

Los resultados obtenidos sugieren que los T6SS codificados en SPI-6 y SPI-19 no participan en la internalización o supervivencia intracelular de *S. Dublin* en macrófagos murinos.

4. DISCUSIÓN

El T6SS es un sistema de secreción de proteínas ampliamente distribuido en bacterias Gram negativo, encontrándose en patógenos humanos, animales y de plantas [18, 22, 34, 49-51]. Por tratarse del último sistema de secreción descrito, ha recibido gran atención en los últimos años. Así, se ha reportado que este complejo aparato de secreción transloca proteínas a diferentes células, tanto procariontes como eucariontes, en un mecanismo que involucra el contacto directo entre la bacteria y la célula blanco [18, 28, 52].

Dentro del género *Salmonella* se han descrito cinco T6SS distribuidos diferencialmente en distintos serotipos y con diferentes orígenes evolutivos [11, 33]. El T6SS codificado en la isla SPI-6 de *S. Typhimurium* ha sido el más estudiado, demostrándose recientemente que se requiere para la replicación intracelular de la bacteria en macrófagos y para la diseminación sistémica en el ratón [37]. En el caso de *S. Dublin*, modelo de estudio utilizado en esta Tesis, los análisis bioinformáticos de nuestro laboratorio identificaron la presencia de dos posibles T6SS codificados en las islas de patogenicidad SPI-6 y SPI-19 [11].

Con estos antecedentes, los objetivos principales de este trabajo fueron determinar si ambos sistemas de secreción se expresan en cultivos *in vitro*, si son funcionales y, finalmente, si uno o ambos sistemas contribuyen a los procesos de invasión y supervivencia intracelular de la bacteria en macrófagos murinos RAW 264.7. Aunque *S. Dublin* es un patógeno principalmente del ganado bovino, este tipo celular se utilizó debido a que esta bacteria también puede colonizar sistémicamente el ratón, diseminándose a través de las células del sistema retículoendotelial [53]. Por su parte, el modelo murino de infección ha sido utilizado por muchos años para estudiar la patogenicidad de distintos serotipos de *Salmonella* y es ampliamente aceptado [54-56].

A través del uso de fusiones transcripcionales y traduccionales al reportero fluorescente GFP, se detectó la expresión de las proteínas VgrG codificadas en ambos T6SS. VgrG es uno de los 13 componentes conservados de un T6SS y de gran importancia para el funcionamiento del sistema, por lo cual la producción de esta proteína es un indicador de la expresión del sistema [17]. Se observó la expresión génica y la producción de VgrG sólo cuando la bacteria se encontraba en contacto con los macrófagos, no así en los

medios de cultivo de dichas células, sugiriendo que la interacción bacteria-célula es esencial para gatillar su expresión. Sin embargo, el número de bacterias dentro de la población en las que es posible observar la expresión y producción de los componentes del T6SS es pequeña, siendo menor al 10%. Los T6SS generalmente poseen una baja expresión dentro de la población bacteriana, es por eso que en muchos trabajos realizados hasta la fecha es necesario recurrir a cepas que sobre expresan estos sistemas *in vitro* [19, 57, 58].

Con respecto a la funcionalidad de los T6SS, es decir si ocurre translocación de una o ambas VgrG desde la bacteria hacia el citoplasma del macrófago, el ensayo utilizado permitió observar en forma muy ocasional este fenómeno. No obstante, los resultados indican que el T6SS codificado en SPI-6 se activa a tiempos tardíos post-internalización; en tanto que el T6SS codificado en SPI-19 es activo solamente a tiempos tempranos post-infección. Será necesario a futuro confirmar estos resultados utilizando metodologías de detección cuantitativas como el uso de una fusión de *vgrG* al epítipo GSK, el cual es fosforilado una vez que la proteína ingresa a la célula, permitiéndonos analizar por medio de "Western blot" la translocación de proteínas al citoplasma eucarionte [59].

Los ensayos de internalización y supervivencia intracelular bacteriana en macrófagos RAW 264.7 indicaron que ninguno de los dos T6SSs presentes en *S. Dublin* es necesario para estos procesos, ya que las mutantes que carecían de cada uno o de ambos T6SS, o las mutantes con una delección del gen *clpV*, fueron capaces de invadir y de sobrevivir al interior de dichos macrófagos a los mismos niveles que la cepa parental.

Sin embargo, estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la mutante de *S. Dublin* que carece del T6SS codificado en SPI-6 es atenuada en un modelo murino de infección sistémica [Pezoa, datos no publicados]. Una posibilidad que podría explicar estas diferencias es que, *in vivo*, este sistema sí contribuya a la supervivencia de la bacteria al interior de macrófagos. Debido a que una pequeña población expresa los T6SS al interior de macrófagos murinos *in vitro* es posible que, si estos sistemas tienen algún efecto sobre la internalización y supervivencia de estas bacterias, este pase desapercibido debido a que el efecto se diluye en la población analizada. De manera similar a lo observado en este estudio, se ha descrito que *S. Typhimurium* expresa genes al interior de macrófagos en cultivo los cuales no se requieren para la internalización ni supervivencia intracelular *in vitro*; sin embargo, las mutantes de estos genes son

atenuadas *in vivo* [46]. Cabe destacar que el modelo de cultivo celular *in vitro* es una simplificación de lo que ocurre *in vivo* frente a la infección por *Salmonella* ya que no se encuentran presentes otros tipos celulares que pueden tener una función de regulación de la respuesta inmune del macrófago, ni se encuentra un entorno inmune normal. Estos factores podrían promover la expresión de los T6SS al interior de macrófagos *in vivo* y realzar su actividad. Para ejemplificar esta situación, podemos mencionar que se ha reportado que, pese a que *S. Typhimurium* persiste más tiempo en el hospedero murino que *S. Typhi*, estos dos serotipos no presentan diferencias en la supervivencia al interior de macrófagos murinos *in vitro*. Sin embargo, cuando se extraen macrófagos de ratones infectados con estos serovares, *S. Typhi* presenta una menor capacidad de sobrevivir que *S. Typhimurium* [46, 60].

Recientemente, Mulder y cols. reportaron que deleciones de los componentes *icmF* y *clpV*, así como de segmentos internos de la isla SPI-6, disminuyen la replicación de *S. Typhimurium* al interior de macrófagos RAW 264.7 *in vitro* [37]. Cabe mencionar que la composición genética de SPI-6 es distinta en *S. Dublin* y *S. Typhimurium*. Así, en *S. Dublin* no se encuentra presente una región que codifica los ORFs STM0277, STM0278 y STM0279. Si bien STM0278 se encuentra codificado dentro la isla SPI-6 y contribuye a la replicación al interior de macrófagos [37], codifica una proteína de 127 aminoácidos que posee un péptido señal, lo cual sugiere que sería secretada al periplasma de manera independiente del T6SS. Se ha descrito que esta proteína participa en la movilidad de tipo *swarming* en *Salmonella enterica* serovar Newport [62]. Por lo tanto, además de los genes “core” del T6SS y sus genes accesorios, la isla SPI-6 de *S. Typhimurium* contiene ORFs que pueden contribuir a la supervivencia en los macrófagos a través de mecanismos independientes de la función de los T6SS. Esto se ha observado para el caso del ORF SEN1001 codificado en SPI-19 de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, el cual es necesario para la colonización sistémica del hospedero murino y la supervivencia al interior de macrófagos murinos. Sin embargo, *S. Enteritidis* no posee todos los componentes estructurales fundamentales del T6SS codificado en SPI-19, lo cual indica que el rol del ORF SEN1001 es independiente de la función del T6SS codificado en SPI-19 [62]. Es posible entonces que las diferencias observadas en la supervivencia al interior de macrófagos murinos entre *S. Typhimurium* y *S. Dublin* se deban en parte a las variaciones de SPI-6 entre los dos serotipos. Por otra parte, los ensayos de supervivencia en macrófagos realizados por Mulder y cols. difieren

de los de esta Tesis, en cuanto a que estos autores usaron bacterias opsonizadas para realizar las infecciones [37]. Al respecto, se ha descrito que la fagocitosis mediada por el sistema del complemento afecta la maduración de la “*Salmonella containing vacuole*”, afectando el proceso de acidificación de ésta y la expresión de genes de virulencia de *Salmonella*, aumentándose la expresión de componentes de SPI-1 [63, 64].

Es posible también que los T6SSs codificados en *S. Dublin* lleven a cabo funciones al interior del macrófago que no estén relacionadas con la supervivencia intracelular de la bacteria. Recientemente, se ha identificado que *Burkholderia cenocepacia* es capaz de generar cambios en la morfología celular de macrófagos en cultivo por medio de un mecanismo dependiente del T6SS. En ese estudio se determinó que el T6SS promueve la filamentación anormal de actina junto con una disminución en los niveles de Rac-GTP y Cdc42-GTP, miembros de la familia Rho de GTPasas pequeñas que regulan el citoesqueleto de actina. Sin embargo, los investigadores fueron incapaces de identificar algún efector del T6SS responsable de este efecto [58].

Mediante una biblioteca de mutantes de *S. Typhimurium* por inserción de un transposón y su posterior análisis mediante hibridaciones competitivas en microarreglos genómicos de DNA, se observó que una mutación en el ORF STM0290 (perteneciente a la isla SPI-6) se encuentra asociado a una menor persistencia en la colonización sistémica del hospedero en un modelo murino de infección crónica [66]. En nuestro laboratorio hemos determinado que STM0290, el cual también se encuentra presente en *S. Dublin*, posee un homólogo cristalizado. Esta estructura cristalina (pdb: 1TU1) presenta homología estructural con la proteína de unión a Ran, Mog1P (pdb: 1EQ6) [66]. Se ha demostrado que Mog1P actúa como un factor liberador de guanina de la GTPasa pequeña Ran [67]. Estos análisis sugieren que STM0290 corresponde a un nuevo efector del T6SS que actúa como un intercambiador de guanina, provocando la modificación del citoesqueleto de las células eucarióticas. La modificación del citoesqueleto podría afectar los procesos de migración normales de los macrófagos, como se ha observado para el T6SS *B. cenocepacia* al cual se encuentra asociado la pérdida de lamelipodios y de la contracción del segmento posterior de la célula llamado urópodo en macrófagos [58]. Los cambios en la migración normal de los macrófagos podría afectar la persistencia de la bacteria en los órganos. Un ejemplo de este comportamiento se ha descrito para el efector del T3SS codificado en la isla SPI-2, *Ssel*. Las cepas mutantes en *sseI* tienen una menor capacidad de colonizar

sistémicamente el hospedero murino y son atenuadas en la infección crónica; sin embargo, la supervivencia de estas mutantes en macrófagos no se ve afectada. Los investigadores descubrieron que Seel es capaz de afectar la motilidad de los macrófagos infectados tanto *in vitro* como *in vivo* y esta capacidad da cuenta de su función tanto en la colonización sistémica del hospedero como del rol en la infección crónica [65, 68, 69].

Con respecto al T6SS codificado en la isla SPI-19, las mutantes en este sistema no mostraron defectos en internalización o supervivencia intracelular *in vitro* en macrófagos RAW 264.7. Los experimentos de colonización *in vivo* en los modelos murinos y aviares tampoco mostraron una atenuación en la virulencia por efecto de la delección de SPI-19 [Pezoa, datos no publicados]. Así, es posible que este sistema haya evolucionado para contribuir a la infección del hospedero bovino por *S. Dublin*. Se podría contestar esta hipótesis utilizando macrófagos primarios de bovino para estudiar el comportamiento de las mutantes en SPI-19 T6SS. Sin embargo, contar con el modelo bovino *in vivo* está fuera de nuestro alcance.

5. CONCLUSIONES

- 1.- Tanto el T6SS codificado en SPI-6 como el codificado en SPI-19 de *S. Dublin* se expresan al interior de macrófagos murinos RAW 264.7 desde tiempos tempranos de infección. Esta expresión no se observa cuando la bacteria crece en el medio de cultivo celular en ausencia de macrófagos.
- 2.- Los T6SS de *S. Dublin* se expresan en un bajo porcentaje de los macrófagos infectados.
- 3.- Los T6SS codificados en el genoma de *S. Dublin* no contribuyen significativamente a la internalización y supervivencia intracelular de esta bacteria en macrófagos RAW 264.7.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Mastroeni, P. and D. Maskell, *Salmonella infections : clinical, immunological, and molecular aspects*. Advances in molecular and cellular microbiology. 2006, Cambridge, UK ; New York: Cambridge University Press. xviii, 381 p., 6 p.
2. Valdez, Y., R.B. Ferreira, and B.B. Finlay, *Molecular mechanisms of Salmonella virulence and host resistance*. Curr Top Microbiol Immunol, 2009. **337**: p. 93-127.
3. Majowicz, S.E., et al., *The Global Burden of Nontyphoidal Salmonella Gastroenteritis*. Clinical Infectious Diseases, 2010. **50**(6): p. 882-889.
4. Carrique-Mas, J.J., et al., *Salmonella infection in cattle in Great Britain, 2003 to 2008*. Vet Rec, 2010. **167**(15): p. 560-5.
5. Fierer, J., *Invasive Salmonella dublin infections associated with drinking raw milk*. West J Med, 1983. **138**(5): p. 665-9.
6. Center for Disease Control., Centers for Disease Control (U.S.), and National Communicable Disease Center (U.S.), *Salmonella Surveillance: Annual Summary, 2006*, U.S. Dept. of Health, Education, and Welfare: Atlanta, Ga. p. v. 2008.
7. Lahiri, A., et al., *Visiting the cell biology of Salmonella infection*. Microbes Infect, 2010. **12**(11): p. 809-18.
8. Monack, D.M., A. Mueller, and S. Falkow, *Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(9): p. 747-65.
9. Haraga, A., M.B. Ohlson, and S.I. Miller, *Salmonellae interplay with host cells*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(1): p. 53-66.
10. Rotger, R. and J. Casadesus, *The virulence plasmids of Salmonella*. Int Microbiol, 1999. **2**(3): p. 177-84.

11. Blondel, C.J., et al., *Comparative genomic analysis uncovers 3 novel loci encoding type six secretion systems differentially distributed in Salmonella serotypes*. BMC Genomics, 2009. **10**: p. 354.
12. Cossart, P. and P.J. Sansonetti, *Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens*. Science, 2004. **304**(5668): p. 242-8.
13. Galan, J.E., *Salmonella interactions with host cells: type III secretion at work*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 53-86.
14. Economou, A., et al., *Secretion by numbers: Protein traffic in prokaryotes*. Mol Microbiol, 2006. **62**(2): p. 308-19.
15. Tseng, T.T., B.M. Tyler, and J.C. Setubal, *Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology*. BMC Microbiol, 2009. **9 Suppl 1**: p. S2.
16. Dehio, C., *Infection-associated type IV secretion systems of Bartonella and their diverse roles in host cell interaction*. Cell Microbiol, 2008. **10**(8): p. 1591-8.
17. Boyer, F., et al., *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**: p. 104.
18. Jani, A.J. and P.A. Cotter, *Type VI secretion: not just for pathogenesis anymore*. Cell Host Microbe, 2010. **8**(1): p. 2-6.
19. Mougous, J.D., et al., *A virulence locus of Pseudomonas aeruginosa encodes a protein secretion apparatus*. Science, 2006. **312**(5779): p. 1526-30.
20. Leiman, P.G., et al., *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): p. 4154-9.
21. Pell, L.G., et al., *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): p. 4160-5.

22. Pukatzki, S., et al., *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): p. 15508-13.
23. Pukatzki, S., S.B. McAuley, and S.T. Miyata, *The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains*. Curr Opin Microbiol, 2009. **12**(1): p. 11-7.
24. Bonemann, G., et al., *Remodelling of VipA/VipB tubules by ClpV-mediated threading is crucial for type VI protein secretion*. EMBO J, 2009. **28**(4): p. 315-25.
25. Erzberger, J.P. and J.M. Berger, *Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2006. **35**: p. 93-114.
26. Basler, M., et al., *Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure*. Nature, 2012. **483**(7388): p. 182-6.
27. Ma, L.S., F. Narberhaus, and E.M. Lai, *The IcmF-family protein TssM exhibits ATPase activity and energizes type VI secretion*. J Biol Chem, 2012.
28. Silverman, J.M., et al., *Structure and Regulation of the Type VI Secretion System*. Annu Rev Microbiol, 2012.
29. Folkesson, A., S. Lofdahl, and S. Normark, *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): p. 537-45.
30. Folkesson, A., et al., *Multiple insertions of fimbrial operons correlate with the evolution of Salmonella serovars responsible for human disease*. Mol Microbiol, 1999. **33**(3): p. 612-22.
31. Das, S. and K. Chaudhuri, *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): p. 287-300.

32. Pukatzki, S., et al., *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): p. 1528-33.
33. Fookes, M., et al., *Salmonella bongori provides insights into the evolution of the Salmonellae*. PLoS Pathog, 2011. **7**(8): p. e1002191.
34. Bingle, L.E., C.M. Bailey, and M.J. Pallen, *Type VI secretion: a beginner's guide*. Curr Opin Microbiol, 2008. **11**(1): p. 3-8.
35. Parsons, D.A. and F. Heffron, *sciS, an icmF homolog in Salmonella enterica serovar Typhimurium, limits intracellular replication and decreases virulence*. Infect Immun, 2005. **73**(7): p. 4338-45.
36. Klumpp, J. and T.M. Fuchs, *Identification of novel genes in genomic islands that contribute to Salmonella typhimurium replication in macrophages*. Microbiology, 2007. **153**(Pt 4): p. 1207-20.
37. Mulder, D.T., C.A. Cooper, and B.K. Coombes, *Type VI Secretion System Associated Gene Clusters Contribute to Pathogenesis of Salmonella enterica serovar Typhimurium*. Infect Immun, 2012.
38. Blondel, C.J., et al., *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): p. e11724.
39. Jimenez, J.C., *Rol del sistema de secreción tipo seis (T6SS) codificado en la isla SPI-19 de Salmonella enterica serovares Enteritidis y Gallinarum, en la interacción con macrófagos*. Memoria de título. Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile., 2010.
40. Datsenko, K.A. and B.L. Wanner, *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6640-5.
41. Raffatellu, M., et al., *Host restriction of Salmonella enterica serotype Typhi is not caused by functional alteration of SipA, SopB, or SopD*. Infect Immun, 2005. **73**(12): p. 7817-26.

42. Cherepanov, P.P. and W. Wackernagel, *Gene disruption in Escherichia coli: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant*. *Gene*, 1995. **158**(1): p. 9-14.
43. Maloy, S.R., *Experimental techniques in bacterial genetics*. The Jones and Bartlett series in biology. 1990, Boston: Jones and Bartlett. 180 P.
44. Schwan, W.R., et al., *Differential bacterial survival, replication, and apoptosis-inducing ability of Salmonella serovars within human and murine macrophages*. *Infect Immun*, 2000. **68**(3): p. 1005-13.
45. Gerlach, R.G., et al., *Rapid engineering of bacterial reporter gene fusions by using Red recombination*. *Appl Environ Microbiol*, 2007. **73**(13): p. 4234-42.
46. Valdivia, R.H. and S. Falkow, *Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells*. *Science*, 1997. **277**(5334): p. 2007-11.
47. Andersen, J.B., et al., *New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria*. *Appl Environ Microbiol*, 1998. **64**(6): p. 2240-6.
48. Hoiseth, S.K. and B.A.D. Stocker, *Aromatic-dependent Salmonella typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines*. *Nature*, 1981. **291**(5812): p. 238-239.
49. Wang, M., et al., *Molecular Characterization of a Functional Type VI Secretion System in Salmonella enterica serovar Typhi*. *Curr Microbiol*, 2011.
50. Burtnick, M.N., et al., *The cluster 1 type VI secretion system is a major virulence determinant in Burkholderia pseudomallei*. *Infect Immun*, 2011. **79**(4): p. 1512-25.
51. de Pace, F., et al., *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): p. 4990-8.
52. Schwarz, S., R.D. Hood, and J.D. Mougous, *What is type VI secretion doing in all those bugs?* *Trends Microbiol*, 2010. **18**(12): p. 531-7.

53. Heffernan, E.J., et al., *Natural history of oral Salmonella dublin infection in BALB/c mice: effect of an 80-kilobase-pair plasmid on virulence*. J Infect Dis, 1987. **155**(6): p. 1254-9.
54. Plant, J. and A.A. Glynn, *Genetics of resistance to infection with Salmonella typhimurium in mice*. J Infect Dis, 1976. **133**(1): p. 72-8.
55. Terakado, N., et al., *Correlation between the presence of a fifty-megadalton plasmid in Salmonella dublin and virulence for mice*. Infect Immun, 1983. **41**(1): p. 443-4.
56. Mittrucker, H.W. and S.H. Kaufmann, *Immune response to infection with Salmonella typhimurium in mice*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(4): p. 457-63.
57. Ballister, E.R., et al., *In vitro self-assembly of tailorable nanotubes from a simple protein building block*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(10): p. 3733-8.
58. Garcia, J.T., et al., *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): p. 5645-57.
59. Rosales-Reyes, R., et al., *The Type VI secretion system of Burkholderia cenocepacia targets multiple Rho family GTPases disrupting the actin cytoskeleton and the assembly of NADPH oxidase complex in macrophages*. Cell Microbiol, 2011.
60. Xu, T., S. Maloy, and K.L. McGuire, *Macrophages influence Salmonella host-specificity in vivo*. Microb Pathog, 2009. **47**(4): p. 212-22.
61. Barak, J.D., et al., *Previously uncharacterized Salmonella enterica genes required for swarming play a role in seedling colonization*. Microbiology, 2009. **155**(Pt 11): p. 3701-9.
62. Silva, C.A., et al., *Infection of mice by Salmonella enterica serovar Enteritidis involves additional genes that are absent in the genome of serovar Typhimurium*. Infect Immun, 2012. **80**(2): p. 839-49.

63. Aderem, A. and D.M. Underhill, *Mechanisms of phagocytosis in macrophages*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 593-623.
64. Drecktrah, D., et al., *The mechanism of Salmonella entry determines the vacuolar environment and intracellular gene expression*. Traffic, 2006. **7**(1): p. 39-51.
65. Lawley, T.D., et al., *Genome-Wide Screen for Salmonella Genes Required for Long-Term Systemic Infection of the Mouse*. PLoS Pathog, 2006. **2**(2): p. e11.
66. Xu, Q., et al., *Crystal structure of an ORFan protein (TM1622) from Thermotoga maritima at 1.75 Å resolution reveals a fold similar to the Ran-binding protein Mog1p*. Proteins, 2006. **65**(3): p. 777-82.
67. Steggerda, S.M. and B.M. Paschal, *The mammalian Mog1 protein is a guanine nucleotide release factor for Ran*. J Biol Chem, 2000. **275**(30): p. 23175-80.
68. Worley, M.J., et al., *Salmonella typhimurium disseminates within its host by manipulating the motility of infected cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(47): p. 17915-20.
69. McLaughlin, L.M., et al., *The Salmonella SPI2 effector Ssel mediates long-term systemic infection by modulating host cell migration*. PLoS Pathog, 2009. **5**(11): p. e1000671.