

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**Participación del efector SseJ en la supervivencia intracelular
de *Salmonella Typhimurium* en *Dictyostelium discoideum***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica
Toxicológica y Diagnóstico Molecular**

Y

Memoria para optar al Título de Bioquímica por:

CONSTANZA PATRICIA MORGADO RUIZ

Directores de Tesis:

Dr. Carlos Santiviago Cid y Dr. Sergio Álvarez Armijo

Santiago-CHILE

Diciembre 2021

|

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

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

CONSTANZA PATRICIA MORGADO RUIZ

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

Director de Tesis:

Dr. Carlos Santiviago Cid _____

Dr. Sergio Álvarez Armijo _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Mario Chiong _____

Dra. Daniela Seelenfreund _____

Dr. Carlos Blondel _____

“The nitrogen in our DNA, the calcium in our teeth, the iron in our blood, the carbon in our apple pies were made in the interiors of collapsing stars. We are made of starstuff.”

– Carl Sagan

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera expresar mi infinita gratitud a mi familia por su apoyo y amor. A mis padres por inculcarme siempre la honradez, el amor incondicional al conocimiento, el trabajo honesto y la vocación de servicio. A Amparo, mi mamá, por su generosidad sin límites y su ética inquebrantable. A mi papá Enrique por su eterna preocupación por sus hijas y por ser mi científico favorito. A mi hermana Laura por ser mi compañera de vida desde que nací, mi alma gemela y mi ejemplo a seguir. A mi abuelita Guillermina por criarme y malcriarme. Las palabras jamás lograrán describir la gratitud y amor que tengo y tendré siempre hacia ustedes.

A Italo por acompañarme sin condiciones durante los últimos 9 años. Gracias por todo el tiempo juntos, por las risas, el apoyo y por seguirme en mi aventura patagónica. También a Ignacia, Sofía, tía Verito y tío Augusto por recibirme como una más de su familia.

A Adyta, mi mejor amiga desde los 4 años. Simplemente no puedo concebir un mundo sin ti.

A mis amigos del Liceo Manuel de Salas, Diegonxo, Kio, Dany, Jadi, Pipe (+Fefita), Víctor, Daphi, Mai y Nacho. Fue un placer y un despelote crecer junto a ustedes.

A mis CabresQ, Dani, Max (+Paulita), Kako, Emilio y Tali. Que nunca nos falten las juntas ni una guitarrita.

También a mis Soas y Tatitas BQs, Flaqui (+Niki), Jessy, Bárbara, Poli, Rani, Felipe (+Susi), Guti, Ariel, Loligo, Dixon, y Juanjo (+Mary). Sin su apoyo y los momentos de distracción la Universidad hubiera sido infinitamente más difícil. Son excelentes amigos y personas y disfruto increíblemente el tiempo que compartimos tanto en grupo como con cada uno por sí solo. No puedo estar más agradecida de haberme encontrado con ustedes.

Agradezco también a mis compañeras y compañeros de generación de Bioquímica, pues tuve la fortuna de pertenecer a un grupo de personas brillantes, solidarias, muy cooperadoras y éticas.

También quisiera expresar mi eterna gratitud al Laboratorio de Microbiología por ser el mejor lugar donde podría haber hecho esta tesis. A los profes Cliff y Sergio por siempre ser muy amables, comprensivos y por su infinita simpatía. Gracias por su orientación, por la formación científica y valórica que inculcan a todos sus estudiantes y por siempre preocuparse más allá de lo científico. A Kamo por haberme recibido como su estudiante de unidad, enseñándome con cariño y paciencia, a Andrea por su alegría y su disposición a ayudar siempre, a Pali por siempre escucharme y consolarme, a Chinchí porque simplemente es una persona maravillosa en todo sentido, a Jimmy por toda la ayuda en el estudio y en esta tesis, a Feña por ayudarme sin condiciones desde el 2010 y por nuestra quejoterapia, a Bayron por ser adorable, a Héctor por ser el mejor ahijado que podría haber pedido, a Italo por su calidez, a Bea por hacerme reír tanto con su sentido del humor, a Marce por su ternura y ser la niña de unidad soñada, a Bilzi por su infinita energía y cariño y a Gabriel por su simpatía. Muchas gracias a todos y todas por su apoyo, por siempre estar dispuestos a ayudar, por las risas, los consejos y la camaradería. Todos son brillantes en mente y en alma. Me falta elocuencia para describir lo maravillosos que son.

También quisiera agradecer a los miembros de la comisión: a la profe Daniela por toda la ayuda y comprensión brindada cuando lo he necesitado, al profe Mario por sus magistrales clases en pizarra y al profe Blondel por siempre motivar con alegría y amabilidad. He aprendido mucho de ellos durante la carrera y en esta tesis. Valoro tremendamente el conocimiento que me han entregado como maestros y la forma en que lo hacen. Muchísimas gracias.

Finalmente quisiera agradecer al lugar que me educó desde pre-kinder hasta IV medio: el Liceo Experimental Manuel de Salas, el cual me entregó una formación valórica y una visión crítica de la realidad que no se encuentra en otro establecimiento. Tuve la fortuna de tener como maestras y maestros a Marcia, Alecita, Andrea, Claudia, Bombero y tío Fisi, profesores de áreas tan diversas como filosofía, biología, química, lenguaje, historia y física. Siempre estaré orgullosa de haber pertenecido al LMS, dónde recibí una educación basada en la ética, la verdad, el pensamiento crítico, el cariño y la empatía.

Gracias, totales.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, bajo la dirección de los profesores Carlos A. Santiviago y Sergio A. Álvarez y fue financiada por los proyectos FONDECYT 1171844 y 1212075.

PUBLICACIONES

Fernández, P. A., Zabner, M., Ortega, J., **Morgado, C.**, Amaya, F., Vera, G., Rubilar, C., Salas, B., Cuevas, V., Valenzuela, C., Baisón-Olmo, F., Álvarez, S. A., Santiviago, C. A. (2021). Novel Template Plasmids pCyaA'-Kan and pCyaA'-Cam for Generation of Unmarked Chromosomal *cyaA'* Translational Fusion to T3SS Effectors in *Salmonella*. *Microorganisms* **9**(3):475. doi: 10.3390/microorganisms9030475.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS INTERNACIONALES

Constanza Morgado, Jaime Ortega, Gabriel Vera, Andrea Sabag, Camila Valenzuela, Sergio Álvarez, Carlos Santiviago. “Caracterización funcional del efector SseJ de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: secreción *in vitro*, expresión intracelular y rol en la supervivencia bacteriana en la ameba *Dictyostelium discoideum*”. XXV Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM 2021), 25 al 28 de agosto, 2021, Asunción, Paraguay.

Marcela Zabner, **Constanza Morgado**, Jaime Ortega, Fernando Amaya, Camila Valenzuela, Sergio Álvarez, Carlos Santiviago. “Contribución de la proteína efectora SopB de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en la evasión de la vía de degradación lisosomal en *Dictyostelium discoideum*”. XXV Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM 2021), 25 al 28 de Agosto, 2021, Asunción, Paraguay.

Fernando Baisón, Beatriz Salas, Jaime Ortega, Andrea Sabag, **Constanza Morgado**, Gabriel Vera, Sergio Álvarez, Carlos Santiviago. “Estudio preliminar de la translocación de efectores de *Salmonella enterica* en *Dictyostelium discoideum* mediante fusiones CyaA’”. XXVII Congreso Nacional de Microbiología 2019 de la Sociedad Española de Microbiología (SEM), 5 al 8 de julio, 2019 Málaga, España.

Jaime Ortega, Andrea Sabag, **Constanza Morgado**, Camila Valenzuela, Sergio A. Álvarez y Carlos A. Santiviago. “Contribución de los efectores SipA, SseF y SseG en la supervivencia intracelular de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en

Dictyostelium discoideum” XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM 2018), 13 al 16 de noviembre, 2018, Santiago, Chile.

Constanza Morgado, Jaime Ortega, Andea Sabag, Camila Valenzuela, Sergio Álvarez, Carlos Santiviago. “Rol del efector SseJ en la internalización y supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en la ameba *D. discoideum*” XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM 2018), 13 al 16 de noviembre, 2018, Santiago, Chile.

Camila Valenzuela, Andrea Sabag, Macaerna Varas, Ítalo Urrutia, **Constanza Morgado**, Bayron Labra, Francisco Chávez., Carlos Santiviago. “*Salmonella Typhimurium* requires SopB and SifA to survive intracellularly in a vacuolar compartment in *Dictyostelium discoideum*”. 5th ASM Conference on Salmonella, 29 de agosto al 1 de Septiembre, 2016, Postdam, Alemania.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS NACIONALES

Marcela Zabner, Paulina Fernández, **Constanza Morgado**, Jaime Ortega, Gabriel Vera, Fernando Baisón-Olmo, Camila Valenzuela, Sergio A. Álvarez y Carlos A. Santiviago. “Construcción de los vectores pCyaA’-Kan y pCyaA’-Cam para la generación de fusiones cromosomales de proteínas efectoras de *Salmonella Typhimurium* al reportero CyaA’ y la detección de su translocación a células eucariontes”. 1^{er} Congreso de Estudiantes de Posgrado del Campus Eloísa Díaz de la Universidad de Chile - Versión Virtual (CEPCN 2020), 10 al 11 de diciembre, 2020, Santiago, Chile.

Marcela Zabner, Paulina Fernández, **Constanza Morgado**, Jaime Ortega, Gabriel Vera, Fernando Baisón-Olmo, Camila Valenzuela, Sergio A. Álvarez y Carlos A. Santiviago. “Generación de fusiones de proteínas efectoras de *Salmonella Typhimurium* al reportero CyaA’ y detección de su translocación a células eucariontes durante el proceso de infección”. Congreso Digital SOMICH, 2 al 4 de diciembre, 2020, Santiago, Chile.

Constanza Morgado, Jaime Ortega, Gabriel Vera, Andrea Sabag, Camila Valenzuela, Sergio A. Álvarez y Carlos A. Santiviago. “Caracterización de la secreción del efector

SseJ y su rol en la supervivencia intracelular de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en la ameba *D. discoideum*". XLI Congreso Chileno de Microbiología, 5 al 8 de noviembre, 2019, Puerto Varas, Chile.

Marcela Zabner, Paulina A Fernández, **Constanza Morgado**, Jaime Ortega, Gabriel Vera, Víctor Cuevas, Camila Valenzuela, Sergio A. Álvarez y Carlos A. Santiviago. "Construcción del vector pCLF4-cyaA' para la generación de fusiones cromosomales de proteínas efectoras de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium al reportero CyaA'". XLI Congreso Chileno de Microbiología, 5 al 8 de noviembre, 2019, Puerto Varas, Chile.

Jaime Ortega, Andrea Sabag, Camila Valenzuela, Ítalo M. Urrutia, **Constanza Morgado**, Sergio A. Álvarez y Carlos A. Santiviago. "Contribución de los efectores SipA, SseF y SseG en la supervivencia intracelular de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en compartimientos vacuolares de *Dictyostelium discoideum*". XLI Congreso Chileno de Microbiología, 5 al 8 de noviembre, 2019, Puerto Varas, Chile.

ÍNDICE GENERAL

Índice General	X
Índice de Tablas y Figuras	XIV
Abreviaturas.....	XVI
Resumen	XIX
Abstract	XXI
1.- Introducción	1
1.1.- Aspectos generales de <i>Salmonella</i>	1
1.2.- Factores de virulencia de <i>Salmonella</i> : los sistemas de secreción de tipo 3 y sus efectores	3
1.3.- Interacción de <i>Salmonella</i> con protozoos.....	17
1.4.- <i>Dictyostelium discoideum</i> : un nuevo modelo de estudio para la interacción bacteria-protocoo	20
2.- Hipótesis	23
3.- Objetivo General.....	23
4.- Objetivos Específicos.....	23
5.- Materiales y Métodos	24
5.1.- Reactivos	24
5.2.- Cepas Bacterianas	26
5.3.- Plasmidios	27
5.4.- Partidores.....	27
5.5.- Medios y condiciones de cultivo bacteriano	28
5.6.- Cepas, medios y condiciones de cultivo de <i>Dictyostelium discoideum</i>	28
5.7.- Construcción de fusiones génicas plasmidiales a reportero CyaA'	29
5.7.1.- Extracción de DNA genómico	29
5.7.2.- Obtención de productos de PCR del gen <i>sseJ</i>	30

5.7.3.- Electroforesis de DNA en geles de agarosa	30
5.7.4.- Clonamiento en vector comercial pGEM-T Easy	31
5.7.5.- Obtención de <i>E. coli</i> DH5 α electrocompetentes y transformación con el plasmidio pGEM-T:: <i>sseJ</i>	31
5.7.6.- Confirmación de la adquisición del pGEM-T:: <i>sseJ</i> mediante PCR de colonias	32
5.7.7.- Extracción de los plasmidios	32
5.7.8.- Digestión mixta y purificación desde gel de agarosa preparativo para obtención de inserto de vector de expresión	33
5.7.9.- Ligación a vector pMMB207:: <i>cyaA'</i>	34
5.7.10.- Obtención de <i>S. Typhimurium</i> electrocompetentes y transformación con el plasmidio pMMB207:: <i>cyaA'</i>	34
5.8.- Secreción de la proteína SseJ-CyaA' expresada desde una fusión plasmidial <i>in vitro</i> mediante <i>western blot</i>	35
5.8.1.- Preparación de muestras de lisados bacterianos para detección de proteínas por electroforesis	35
5.8.2.- Análisis mediante SDS-PAGE	36
5.8.3.- Inmunodetección de la proteína de fusión SseJ-CyaA' mediante <i>western blot</i>	36
5.8.4.- Preparación de muestras de sobrenadantes de cultivos bacterianos para <i>western blot</i>	37
5.8.5.- Inmunodetección de la proteína de fusión SseJ-CyaA' en sobrenadantes de cultivos mediante <i>western blot</i>	40
5.9.- Generación de cepas mutantes $\Delta invA$ y $\Delta ssaD$ con fusiones génicas cromosomales al reportero CyaA'	40
5.9.1.- Eliminación del <i>cassette</i> de resistencia a antibiótico para la generación de la cepa <i>sseJ_cyaA'</i> -FRT	40
5.9.2.- Transducción de los alelos mutantes $\Delta invA$ y $\Delta ssaD$ al fondo genético <i>sseJ::cyaA'</i>	41

5.9.2.1.- Preparación del lisado de las partículas transductoras	42
5.9.2.2.- Transducción	42
5.9.2.3.- Comprobación y selección de las transductantes	43
5.10.- Comprobación de la producción de la proteína de fusión SseJ-CyaA' en las cepas <i>sseJ_cyaA'</i> -FRT, $\Delta invA/sseJ_cyaA'$ -FRT y $\Delta ssaD/sseJ_cyaA'$ -FRT ..	43
5.10.1.- Preparación de muestras de lisados de bacterias para <i>western blot</i>	44
5.10.2.- Detección de la proteína de fusión SseJ-CyaA' en lisados bacterianos	44
5.11.- Determinación de la translocación del efector SseJ de <i>S. Typhimurium</i> al citoplasma de <i>D. discoideum</i>	44
5.11.1.- Ensayo de translocación del efector SseJ de <i>S. Typhimurium</i> al citoplasma de <i>D. discoideum</i> AX4	46
5.12.- Construcción de cepa mutante $\Delta sseJ$ de <i>S. Typhimurium</i> 14028s	47
5.12.1.- Amplificación de <i>cassette</i> de resistencia antibiótica por PCR....	47
5.12.2.- Obtención de bacterias electrocompetentes y transformación con DNA plasmidial	48
5.12.3.- Mutagénesis mediante intercambio alélico con productos de PCR	50
5.12.4.- Confirmación de las mutantes obtenidas mediante PCR	51
5.13.- Transducción de alelo mutante $\Delta sseJ$ en <i>S. Typhimurium</i> 14028s	52
5.14.- Ensayos de supervivencia por competencia <i>in vitro</i> entre cepas de <i>S. Typhimurium</i> en <i>D. discoideum</i> AX4	52
5.14.1.- Ensayos de competencia para evaluar internalización y supervivencia de <i>S. Typhimurium</i> en <i>D. discoideum</i>	52
5.14.2.- Expresión de los resultados obtenidos y análisis estadístico	55
6.- Resultados	56
6.1.- Construcción de la fusión plasmidial pMMB207:: <i>sseJ-cyaA'</i>	57

6.2.- Producción de la proteína SseJ en <i>S. Typhimurium</i> 14028s	59
6.3.- Secreción <i>in vitro</i> del efector SseJ al medio de cultivo	61
6.4.- Translocación de la proteína SseJ durante la infección de <i>S. Typhimurium</i> en <i>D. discoideum</i>	64
6.4.1.- Generación de la cepa portadora de la fusión génica <i>sseJ::cyaA'</i> -FRT y de las cepas mutantes $\Delta invA$ y $\Delta ssaD$ portadoras de la fusión.....	65
6.4.2.- Producción de la proteína de fusión SseJ-CyaA' desde las cepas <i>sseJ_cyaA'</i> -FRT, $\Delta invA/sseJ_cyaA'$ -FRT y $\Delta ssaD/sseJ_cyaA'$ -FRT ...	66
6.4.3.- Translocación de la proteína SseJ durante la infección de <i>S. Typhimurium</i> en <i>D. discoideum</i>	67
6.5.- Efecto de SseJ sobre la internalización y supervivencia intracelular de <i>S. Typhimurium</i> en <i>D. discoideum</i>	69
7.- Discusión	74
7.1.- Producción de la proteína efectora SseJ de <i>Salmonella Typhimurium</i> y secreción al medio de cultivo.....	76
7.2.- Translocación de la proteína efectora SseJ de <i>S. Typhimurium</i> al citoplasma de <i>D. discoideum</i>	81
7.3.- Rol del efector SseJ en la internalización de <i>S. Typhimurium</i> en <i>D. discoideum</i> durante la infección	84
7.4.- Contribución del efector SseJ en la supervivencia intracelular de <i>S. Typhimurium</i> en <i>D. discoideum</i>	85
8.- Conclusiones	89
9.- Bibliografía	90

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1.	Cepas bacterianas utilizadas en esta tesis	26
Tabla 2.	Plasmidios utilizados en este trabajo	27
Tabla 3.	Listado de oligonucleótidos partidores	27

FIGURAS

Figura 1.	Ciclo infeccioso de <i>Salmonella</i>	3
Figura 2.	Los sistemas de secreción de tipo 3	6
Figura 3.	Estructura de los sistemas de secreción de tipo 3 y sus efectores	8
Figura 4.	Vacuola contenedora de <i>Salmonella</i> (SCV) y filamentos inducidos por <i>Salmonella</i> (SIFs)	10
Figura 5.	Ensayo de secreción del efector SseJ de <i>Salmonella</i> al medio de cultivo	38
Figura 6.	Precipitación de proteínas mediante extracción MetOH-cloroformo ...	39
Figura 7.	Esquema de eliminación del <i>cassette</i> de resistencia a Kan	41
Figura 8.	Ensayo de expresión del efector SseJ de <i>Salmonella</i> en condiciones inductoras de las islas de patogenicidad	45
Figura 9.	Ensayo de translocación del efector SseJ de <i>Salmonella</i> al citoplasma de <i>D. discoideum</i>	49
Figura 10.	Generación de cepas mutantes de <i>S. Typhimurium</i> mediante el método “Red-swap”	50
Figura 11.	Ensayo de internalización y supervivencia de <i>S. Typhimurium</i> durante la infección de <i>D. discoideum</i>	54
Figura 12.	Construcción del plasmidio pGEM-T::sseJ-cyaA'	58

Figura 13.	Construcción del plasmidio pMMB207sseJ-cyaA'	59
Figura 14.	La proteína de fusión SseJ-CyaA' es producida a partir de una fusión plasmidial	61
Figura 15.	El efector SseJ es secretado al medio de cultivo mediante el T3SS-2 .	63
Figura 16.	El efector SseJ es producido por <i>S. Typhimurium</i> bajo condiciones inductoras de los genes de la SPI-2.....	66
Figura 17.	El efector SseJ es expresado por <i>S. Typhimurium</i> durante la infección de <i>D. discoideum</i>	68
Figura 18.	Confirmación de la generación de la cepa mutante mediante PCR de colonias.....	70
Figura 19.	Contribución del efector SseJ en la internalización y supervivencia intracelular de <i>S. Typhimurium</i> en <i>D. discoideum</i>	73

ABREVIATURAS

°C:	Grados Celsius
μL:	Microlitros
μm:	Micrómetros
μM:	Micromolar
Amp:	Ampicilina
AMPc:	Adenosin monofosfato cíclico
Amp ^R :	Resistente a ampicilina
APS:	Persulfato de amonio
Cam:	Cloranfenicol
Cam ^R :	Resistente a cloranfenicol
CEs:	Ésteres de colesterol
CI:	Índice de competencia
dATP:	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP:	Desoxicitosina trifosfato
dGTP:	Desoxiguanosina trifosfato
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
dTTP:	Desoxitimidina trifosfato
EBU:	Azul de Evans - Uranina
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
EtOH:	Etanol
g:	Gramos
GCAT:	Glicerofosfolípido:colesterol aciltransferasa
gDNA:	DNA genómico
GDP:	Guanosina difosfato
Gm:	Gentamicina
GTPasa:	Guanosina trifosfatasa
h:	Horas
HA:	Hemaglutinina

HRP:	Peroxidasa de rábano
IPTG:	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido
Kan:	Kanamicina
Kan ^R :	Resistente a kanamicina
Kb:	Kilobases
KV:	Kilovolts
LAMP:	<i>Lysosome-Associated Membrane Glycoprotein</i>
LAP:	<i>Lysosomal Acid Phosphatase</i>
LB:	Luria-Bertani
LDs:	<i>Lipid droplets</i>
LPS:	Lipopolisacárido
M:	Concentración molar
MetOH:	Metanol
mg:	Miligramos
min:	Minutos
mL:	Mililitros
mM:	Milimolar
MOI:	Multiplicidad de infección
ng:	Nanogramos
NRK:	<i>Normal Rat Kidney</i>
OD _{600nm} :	Densidad óptica a 600 nanómetros
OSBP:	<i>Oxysterol-binding protein</i>
pb:	Pares de bases
PBS:	Suero fisiológico tamponado con fosfato
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PLA:	Fosfolipasa
PVDF:	Fluoruro de polivinilideno
Rab:	<i>Ras-related protein</i>
Rho:	<i>Ras homologous</i>

s:	Segundos
SCV:	Vacuola contenedora de <i>Salmonella</i>
SDS:	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE:	Electroforesis en geles desnaturantes de poliacrilamida
SEM:	Error estándar de la media
SIFs:	Filamentos inducidos por <i>Salmonella</i>
SKIP:	<i>SifA and Kinesin Interacting Protein</i>
SPI:	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i>
Str:	Estreptomicina
T3SS:	Sistema de secreción de tipo 3
TAE:	Tris base-acetato-EDTA
TBS:	Suero fisiológico tamponado con Tris
TBS-T:	Suero fisiológico tamponado con Tris y suplementado con Tween 20
TCA:	Ácido tricloroacético
Temed:	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina
TGN:	<i>Trans-Golgi Network</i>
UFC:	Unidad formadora de colonias
UV:	Ultravioleta
V:	Volts
v/v:	Volumen/volumen
vATPasa:	ATPasa vacuolar
VIH:	Virus de la inmunodeficiencia humana
x g:	Aceleración gravitacional

RESUMEN

La patogenicidad de *Salmonella* se debe en gran medida a la existencia de factores de virulencia conocidos como sistemas de secreción de tipo 3 (T3SS) y sus proteínas efectoras (también llamadas “efectores”), codificados en islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPIs) o en otras zonas del genoma. Los T3SS más estudiados son los que se encuentran codificados en SPI-1 y SPI-2 (T3SS-1 y T3SS-2, respectivamente). Existen diversos efectores que contribuyen a la supervivencia intracelular de la bacteria mediante distintos mecanismos. Por ejemplo, el desarrollo de la “vacuola contenedora de *Salmonella*” (SCV), compartimento donde reside la bacteria luego de su internalización, y la formación de estructuras conocidas como “filamentos inducidos por *Salmonella*” (SIFs), proyecciones membranosas que irradian desde la SCV y que se relacionan a la replicación intracelular de la bacteria.

SseJ es un efector translocado al citoplasma de la célula hospedera mediante el T3SS-2. Está relacionado a la formación de los SIFs mediante la modificación de la composición lipídica de la SCV, permitiendo la proyección de estas estructuras membranosas. Asimismo, se ha reportado que una mutante Δ sseJ de *S. Typhimurium* presenta defectos en la supervivencia intracelular en macrófagos murinos y es atenuada en ratones. Sin embargo, no se ha estudiado el papel de este efector durante la interacción de *Salmonella* con hospederos alternativos. En este trabajo, se planteó dilucidar si el efector SseJ es producido y translocado al citoplasma de *D. discoideum* durante la infección con *S. Typhimurium* y si contribuye a la supervivencia intracelular de la bacteria al interior de esta ameba.

Para caracterizar la secreción de SseJ, se construyó el plasmidio pMMB207::*sseJ cyaA'* que codifica una fusión de este efector con el reportero CyaA'. Este plasmidio se transformó en *S. Typhimurium* silvestre y en mutantes que poseen inactivado el T3SS-1 o T3SS-2. Los resultados obtenidos confirmaron que SseJ es secretado *in vitro* a través del T3SS-2. Por otra parte, se evaluó la expresión y producción del efector SseJ bajo condiciones inductoras de los genes asociados a SPI-1 y SPI-2 mediante la construcción una fusión génica cromosomal del gen *sseJ* al reportero *cyaA'*. Nuestros resultados mostraron que la fusión se produce en respuesta a las señales ambientales que normalmente regulan la expresión del gen *sseJ*. Además, se evaluó mediante *western blot* la producción de SseJ-CyaA' desde la fusión cromosomal durante la infección de *D. discoideum*. La proteína de fusión se detectó en bacterias intracelulares recuperadas desde amebas luego de 3 y 6 horas de infección, confirmando que dentro de *D. discoideum* existen las condiciones necesarias para la expresión y producción del efector. A pesar de esto, no fue posible confirmar experimentalmente la translocación de la proteína de fusión desde la bacteria al citoplasma de la ameba durante el proceso infeccioso. Finalmente, para evaluar el rol de SseJ en la interacción de *S. Typhimurium* y *D. discoideum* se realizaron ensayos de competencia donde se comparó la supervivencia intracelular de una mutante $\Delta sseJ$ y de la cepa silvestre en esta ameba. Nuestros resultados mostraron que la mutante $\Delta sseJ$ presenta defectos de supervivencia intracelular en *D. discoideum* a partir de 1 hora post infección. En conjunto, esta evidencia indica que el efector SseJ de *S. Typhimurium* es secretado mediante el T3SS-2, se produce cuando la bacteria reside al interior de *D. discoideum* y contribuye en la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en esta ameba.

ABSTRACT

“Role of effector protein SseJ in the intracellular survival of *Salmonella* Typhimurium in *Dictyostelium discoideum*”

The pathogenicity of *Salmonella* is mainly due to the existence of virulence factors known as type 3 secretion systems (T3SS) and their effector proteins, also known as "effectors", encoded in *Salmonella* pathogenicity islands (SPIs) or in other regions of the genome. The most widely studied T3SS are those encoded in SPI-1 and SPI-2 (T3SS-1 and T3SS-2, respectively). Several effectors contribute to the intracellular survival of *Salmonella* by different mechanisms. For example, the development of the "Salmonella-containing vacuole" (SCV), a compartment where the bacteria reside after internalization, and the formation of structures known as "Salmonella-induced filaments" (SIFs), which are membranous projections that radiate from the SCV and are related to the intracellular replication of the bacteria.

SseJ is an effector translocated to the host cell cytoplasm via T3SS-2. It is involved in the formation of SIFs by modifying the lipid composition of the SCV, allowing the projection of those membranous structures. Also, a Δ sseJ mutant of *S. Typhimurium* has been reported to exhibit intracellular survival defects in murine macrophages and is attenuated in mice. However, the role of this effector during the interaction of *Salmonella* with alternative hosts has not been studied. In this work, we aimed to elucidate if the effector SseJ is produced and translocated to the cytoplasm of *D. discoideum* during infection with *S. Typhimurium* and if it contributes to the intracellular survival of the bacteria within this amoeba.

To characterize SseJ secretion, we constructed the plasmid pMMB207::*sseJ_cyaA'* encoding a fusion of this effector with the CyaA' reporter. This plasmid was transformed

into wild-type *S. Typhimurium* and mutants with inactivated T3SS-1 or T3SS-2. The results obtained confirmed that SseJ is secreted *in vitro* through T3SS-2. Furthermore, the expression and production of the SseJ effector was evaluated under conditions that induce the expression of SPI-1- and SPI-2-associated genes by constructing a chromosomal gene fusion of the *sseJ* gene to the *cyaA'* reporter. Our results showed that the fusion is produced in response to environmental signals that regulate the expression of the *sseJ* gene under normal conditions. In addition, the production of SseJ-CyaA' from the chromosomal gene fusion during *D. discoideum* infection was assessed by western blot. The fusion protein was detected in intracellular bacteria recovered from amoebae after 3 and 6 hours of infection, confirming that the necessary conditions for expression and production of the effector exist within *D. discoideum*. Despite this, it was not possible to experimentally confirm the translocation of the fusion protein from the bacterium to the amoeba cytoplasm during the infection. Finally, to evaluate the role of SseJ in the interaction of *S. Typhimurium* and *D. discoideum*, competition assays were performed comparing the intracellular survival of a Δ *sseJ* mutant and the wild-type strain in this amoeba. Our results showed that the Δ *sseJ* mutant exhibits intracellular survival defects in *D. discoideum* from 1 h post infection. Taken together, this evidence indicates that the *S. Typhimurium* effector SseJ is secreted via T3SS-2, is produced when the bacterium resides inside *D. discoideum*, and contributes to the intracellular survival of *S. Typhimurium* in this amoeba.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.-Aspectos generales de *Salmonella*

Salmonella corresponde a un género de bacterias Gram negativo que incluye dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*. Esta última se divide en 6 subespecies: *arizonae*, *diarizonae*, *enterica*, *houtenae*, *indica* y *salamae* (Brenner et al., 2000). Dentro del género *Salmonella* se describen más de 2500 serovares, diferenciándose éstos en sus propiedades bioquímicas y serológicas. La clasificación actual de los serotipos se basa en variaciones antigénicas del lipopolisacárido (antígeno O) y el flagelo (antígeno H) y en la presencia o ausencia de la cápsula de virulencia (antígeno Vi) (Canals et al., 2011).

Con respecto a su importancia clínica, los serovares de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* corresponden al agente etiológico de aproximadamente el 99% de los casos de salmonelosis en animales de sangre caliente. A su vez, *Salmonella bongori* y el resto de las subespecies de *Salmonella enterica* suelen ser bacterias comensales de animales de sangre fría. Sin embargo, se han reportado casos de infecciones esporádicas en seres humanos (Canals et al., 2011). Los distintos serovares de *Salmonella* presentan diferente especificidad de hospedero y causan manifestaciones clínicas muy diversas (Gal-Mor et al., 2014), que abarcan desde una enteritis autolimitada hasta enfermedades sistémicas severas y potencialmente mortales, como la fiebre tifoidea. Cabe destacar que la salmonelosis sistémica se desarrolla corrientemente en individuos inmunosuprimidos, ancianos y neonatos (Scallan et al., 2011; Canals et al. 2011). Por otra parte, hay serovares que son capaces de infectar a un amplio espectro de hospederos, como *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, mientras que

otros infectan a un hospedero específico, como *S. Typhi* y *S. Gallinarum*, que causan enfermedad sistémica sólo en seres humanos y aves, respectivamente (Canals et al., 2011).

Cada año se presenta una gran cantidad de casos de salmonelosis, produciéndose la muerte de cientos de miles de personas nivel mundial. Los principales cuadros clínicos provocados por la bacteria son la enteritis, causada por los serovares no tifoideos, y la fiebre tifoidea, infección sistémica producida por los serovares tifoideos. En algunos casos, los serovares no tifoideos provocan patologías sistémicas en individuos inmunodeprimidos, lo cual es especialmente relevante en regiones de África subsahariana, donde un alto porcentaje de la población se encuentra inmunocomprometida debido a la alta prevalencia del VIH (Canals et al., 2011).

El ciclo infeccioso de *Salmonella* comienza cuando la bacteria es ingerida por el hospedero en agua o alimentos contaminados. Una vez ingresada al sistema digestivo, *Salmonella* sobrevive al pH ácido estomacal para luego colonizar el tracto intestinal. La bacteria invade el epitelio del intestino delgado e ingresa al subepitelio, donde es fagocitada por los macrófagos residentes a los que, eventualmente, utiliza como vehículo para diseminarse por el organismo a través del sistema reticuloendotelial (**Figura 1**). La supervivencia en el interior de las células fagocíticas y el subsecuente transporte de la bacteria permite el desarrollo de la infección sistémica. En el caso de la enteritis, ésta se desarrolla debido a una respuesta inflamatoria local en el intestino provocada por la infiltración de linfocitos polimorfonucleares y la secreción de citoquinas proinflamatorias, teniendo como consecuencia la inflamación de la capa mucosa intestinal (Coburn et al., 2007; Haraga et al., 2008; Bueno et al., 2012).

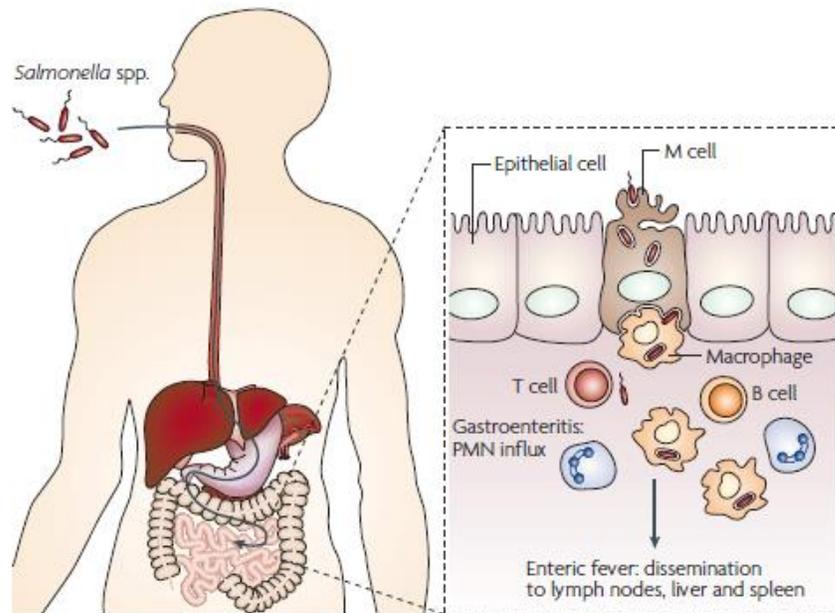


Figura 1.- Ciclo Infeccioso de *Salmonella*. El ciclo infeccioso de *Salmonella* comienza con la ingestión de la bacteria mediante la vía fecal-oral. La bacteria llega al estómago, sobrevive al pH ácido y alcanza el intestino delgado, donde invade el epitelio intestinal, ingresa al subepitelio y es fagocitada por los macrófagos residentes. Éstos, eventualmente, actuarán como vehículos de diseminación, generándose la infección sistémica (Haraga et al., 2008).

1.2.- Factores de virulencia de *Salmonella*: los sistemas de secreción de tipo 3 y sus efectores

La evolución de *Salmonella* como patógeno se ha estudiado extensamente durante las últimas décadas, caracterizándose los mecanismos moleculares que permiten la interacción de la bacteria con distintos hospederos. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) ha sido uno de los modelos de estudio más utilizados, analizándose su interacción con células en cultivo y en modelos animales. Estos estudios han permitido determinar los genes implicados en la virulencia de *Salmonella*: muchos se localizan en elementos genéticos de gran tamaño con evidencia de haber sido adquiridos mediante eventos de transferencia horizontal (Baumler, 1997;

Groisman y Ochman, 1997). Estos elementos genéticos son conocidos como Islas de Patogenicidad de *Salmonella* (SPIs) y están presentes en la mayor parte de los serovares (Marcus et al., 2000). Hasta el momento se han descrito 23 SPIs, las que se encuentran distribuidas diferenciadamente en los distintos serovares. Sólo 5 de estas islas de patogenicidad (SPI-1 a la SPI-5) son conservadas en el genoma de los serovares de *S. enterica* (Desai et al., 2013).

Las islas más estudiadas corresponden a las SPI-1 y SPI-2, debido a que son esenciales para la patogenicidad de la bacteria. Ambas codifican sistemas de secreción de tipo 3 (T3SS-1 y T3SS-2, respectivamente), que corresponden a complejos macromoleculares de al menos 20 subunidades proteicas distintas. Estas estructuras forman un puente entre el citoplasma de la bacteria y el de la célula hospedera, inyectando distintas proteínas conocidas como “efectores”, los cuales resultan de vital importancia en las distintas etapas de la infección (Galan y Curtiss, 1989). El T3SS-1 es esencial para la invasión de las células hospederas, tanto epiteliales como macrófagos, durante la fase intestinal de la infección (Galan y Curtiss, 1989; Alpuche-Aranda et al., 1994; Jones et al., 1994). El contacto de la bacteria con la membrana plasmática de las células epiteliales desencadena la activación de este sistema de secreción. Como consecuencia de esta activación, se inyectan las proteínas efectoras desde el citoplasma de la bacteria al citoplasma de la célula que está siendo infectada, cruzando tanto las membranas de la bacteria como la membrana plasmática de la célula epitelial (**Figura 2**). Estos efectores orquestan los mecanismos que permiten el ingreso de la bacteria, produciéndose la invasión de la célula hospedera (Hardt et al., 1998; Patel y Galan, 2006). Los efectores del T3SS-1 también son esenciales para la invasión y la

supervivencia de *Salmonella* en macrófagos, utilizando estas células fagocíticas como vehículos de diseminación y permitiendo el eventual desarrollo de una infección sistémica (Hernandez et al., 2004; Jiang et al., 2004; Monack et al., 2004; Drecktrah et al., 2005; Lawley et al., 2006; Worley et al., 2006; Brawn et al., 2007).

En contraste, la expresión del T3SS-2 es activada tras la internalización de la bacteria en respuesta a la deprivación de nutrientes y al pH moderadamente ácido que existe en el interior del compartimento membranoso que se forma y donde reside *Salmonella* luego de su ingreso. Este compartimento se conoce como la “vacuola contenedora de *Salmonella*” (SCV). El T3SS-2 y sus proteínas efectoras resultan esenciales para la generación, maduración y mantenimiento de la SCV (**Figura 3**), además de ser requeridos para la virulencia en el modelo murino (Knuff-Janzen et al., 2020). Los efectores del T3SS-2 cruzan la membrana de este compartimento, siendo translocadas hacia el citoplasma de la célula hospedera (Cirillo et al., 1998; Waterman y Holden, 2003), lo que permite la replicación y la supervivencia intracelular de *Salmonella* luego de su ingreso al hospedero (Hensel et al., 1995). Hasta la fecha, se han descrito más de 20 efectores secretados por el T3SS-2, la mayoría de los cuales están relacionados a la consolidación de la SCV (Ramos-Morales, 2012; van der Heijden y Finlay, 2012) y al establecimiento de este compartimento como nicho replicativo para *Salmonella* (Garcia-del Portillo et al., 2008).

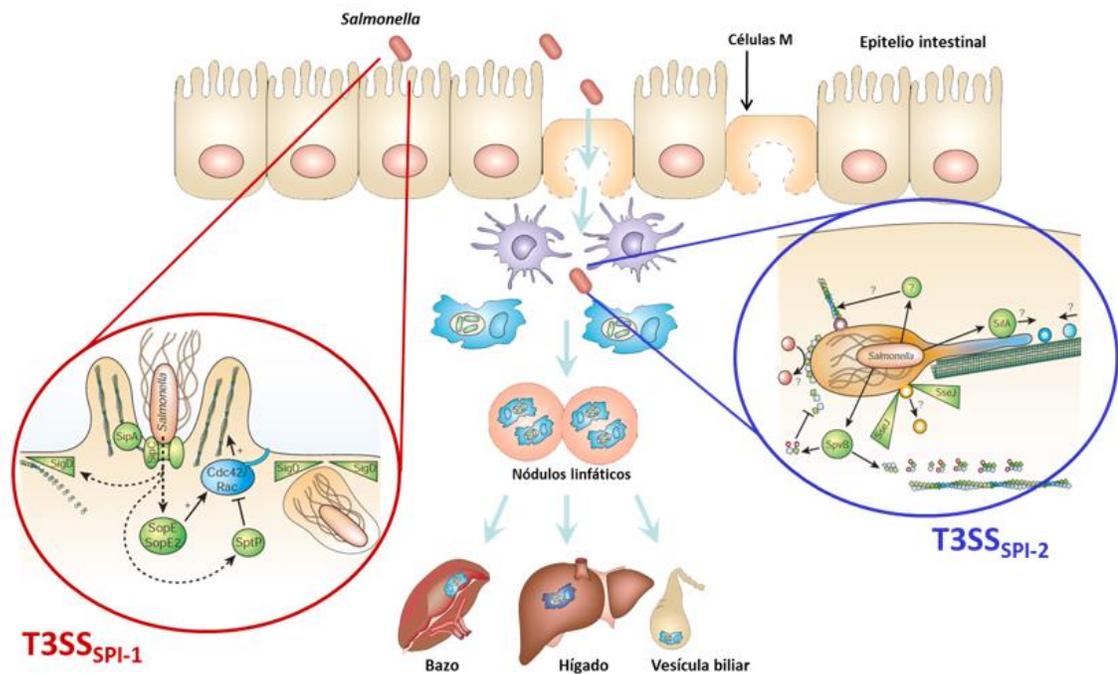


Figura 2.- Los sistemas de secreción de tipo 3. Los T3SS son factores de virulencia que se encuentran codificados en las islas de patogenicidad de *Salmonella*. El T3SS-1, codificado en la SPI-1, es importante para la supervivencia intracelular de la bacteria y es requerido para la invasión de las células epiteliales. La SPI-1 se expresa en respuesta a condiciones ambientales que existen en el intestino. El T3SS-2 cobra importancia durante la invasión de macrófagos, donde es fundamental para la supervivencia intracelular y el desarrollo, maduración y mantenimiento de la SCV, compartimento membranoso donde reside la bacteria internalizada y que utiliza como nicho replicativo. La expresión de la SPI-2 es estimulada por la deprivación de nutrientes y el pH levemente ácido, condiciones que se dan dentro de la SCV luego de la internalización.

La biogénesis de la SCV se clasifica en 3 etapas: temprana, intermedia y tardía (0 a 30 min, 30 min a 5 h y posterior a 5 h luego de ocurrida la infección, respectivamente) (Steele-Mortimer et al., 1999). Durante la primera etapa la vacuola interacciona con los endosomas tempranos, lo que es evidenciado por la adquisición de marcadores de la vía endosomal temprana en la membrana de la SCV, tales como el antígeno-1 y la GTPasa pequeña Rab5 (Steele-Mortimer et al., 1999; Smith et al., 2005). Estos marcadores luego son reemplazados por glicoproteínas asociadas a la membrana

de los lisosomas (LAMPs) aproximadamente desde los 20 min hasta varias horas transcurrida la infección. Además, durante la etapa tardía se incorporan a la membrana de la SCV CD63, la proteína precursora de la fosfatasa ácida lisosomal (LAP), la ATPasa vacuolar (vATPasa), Rab7 y el colesterol (Garcia-del Portillo y Finlay, 1995; Meresse et al., 1999; Steele-Mortimer et al., 1999; Brumell et al., 2001). La presencia de estos marcadores y la evidencia de una relación entre la SCV y el retículo endoplasmático evidencian una relación entre este compartimento y el tráfico endosomal (Knodler y Steele-Mortimer, 2003).

Dentro de la SCV, *Salmonella* altera el contenido lipídico y proteico de este compartimento por medio de los efectores del T3SS-2. Esto desencadena el movimiento de la SCV a través de los microtúbulos y cambios en la morfología celular, como la formación de “filamentos inducidos por *Salmonella*” (SIFs) en la membrana vacuolar, además de polimerización de actina alrededor de la SCV (**Figura 4**) (Stein et al., 1996; Ohlson et al., 2005; Nawabi et al., 2008; Christen et al., 2009; LaRock et al., 2012). Para esto, los distintos efectores cooperan en la manipulación de los mecanismos fisiológicos del hospedero. El efector SifA permite la interacción de la SCV con la red microtubular (Boucrot et al., 2005), PipB2 une la SCV a kinesina, proteína que forma los motores moleculares, permitiendo el transporte a lo largo de los microtúbulos y la extensión de los SIFs (Henry et al., 2006). Otros efectores modulan la membrana vacuolar y su contenido proteico mediante la regulación de elementos del citoesqueleto como microtúbulos y F-actina, los cuales se asocian a la SCV. Algunos efectores del T3SS-1 que persisten en la superficie de la SCV luego de la internalización de *Salmonella* contribuyen a las modificaciones lipídicas y proteicas de esta vacuola.

SteA, SopD2 y SseJ participan en la biogénesis y el movimiento de la SCV dentro de la célula hospedera y en la dinámica de los SIFs (Stein et al., 1996; Guy et al., 2000; Brumell et al., 2002; Ruiz-Albert et al., 2002; Knodler y Steele-Mortimer, 2003; Birmingham et al., 2005; Ohlson et al., 2008; Schroeder et al., 2010; Domingues et al., 2014). Colectivamente, cada uno de estos efectores contribuye en uno o más de los siguientes procesos para establecer a la SCV como un nicho replicativo para *Salmonella*: biogénesis de los SIFs, posicionamiento perinuclear de la SCV, mantenimiento de la estabilidad y modificación de la membrana de la SCV y/o reclutamiento y regulación de la actividad de motores microtubulares (Figueira y Holden, 2012; van der Heijden y Finlay, 2012; LaRock et al., 2015, Knuff-Kanzen et al., 2020).

Los motores moleculares permiten el transporte a lo largo de los microtúbulos y la extensión de los SIFs (Henry et al., 2006). Otros efectores modulan la membrana vacuolar y su contenido proteico mediante la regulación de elementos del citoesqueleto como microtúbulos y F-actina, los cuales se asocian a la SCV. Algunos efectores del T3SS-1 que persisten en la superficie de la SCV luego de la internalización de *Salmonella* contribuyen a las modificaciones lipídicas y proteicas de esta vacuola. Por ejemplo, SopB reduce los niveles de lípidos de carga negativa de la superficie de la SCV, provocando la disociación de proteínas del tráfico endocítico de la vacuola (Bakowski et al., 2010). Por su parte, SipA promueve la estabilización de la F-actina en la vacuola (Brawn et al., 2007). Los efectores del T3SS-2 SifA, PipB2, SseF, SseG, SpvB, SteA, SopD2 y SseJ participan en la biogénesis y el movimiento de la SCV dentro de la célula hospedera y en la dinámica de los SIFs (Stein et al., 1996; Guy et al., 2000; Brumell et al., 2002; Ruiz-Albert et al., 2002; Knodler y Steele-Mortimer, 2003; Birmingham et al.,

2005; Ohlson et al., 2008; Schroeder et al., 2010; Domingues et al., 2014). Colectivamente, cada uno de estos efectores contribuye en uno o más de los siguientes procesos para establecer a la SCV como un nicho replicativo para *Salmonella*: biogénesis de los SIFs, posicionamiento perinuclear de la SCV, mantenimiento de la estabilidad y modificación de la membrana de la SCV y/o reclutamiento y regulación de la actividad de motores microtubulares (Figueira y Holden, 2012; van der Heijden y Finlay, 2012; LaRock et al., 2015, Knuff-Kanzen et al., 2020).

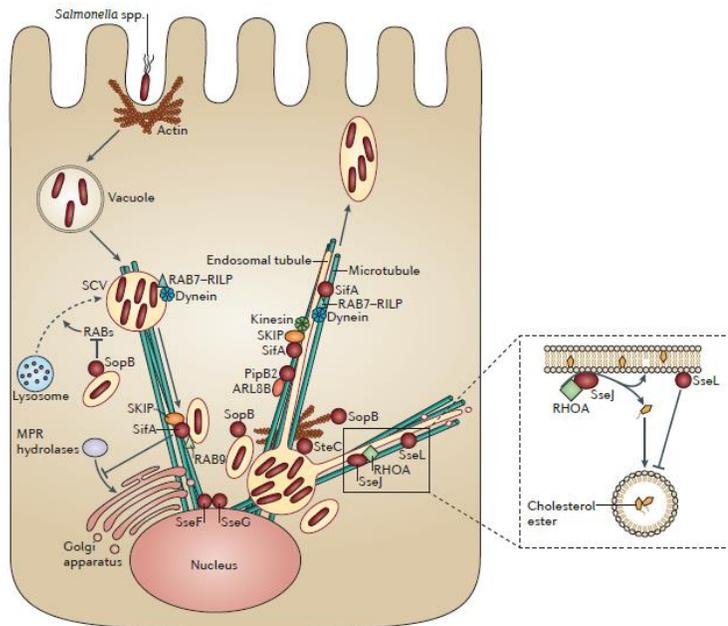


Figura 4.- Vacuola contenedora de *Salmonella* (SCV) y filamentos inducidos por *Salmonella* (SIFs). Una vez dentro de la vacuola, *Salmonella* manipula diversas estructuras celulares, alterando el contenido lipídico y proteico de la célula hospedera mediante los efectores del T3SS-2. Esto genera un cambio en la morfología de los compartimentos membranosos intracelulares, como la generación de SIFs, que corresponden a prolongaciones membranosas que irradian desde la SCV. Para su formación, los efectores manipulan a los componentes proteicos encargados del tráfico intracelular, como los microtúbulos y los motores moleculares kinesina y dineína, permitiendo la prolongación de la membrana de la SCV a lo largo de los microtúbulos de la célula hospedera. Se cree que estas prolongaciones permitirían a la bacteria redireccionar el transporte endosomal, permitiendo a la bacteria acceder a nutrientes endocitados (LaRock et al., 2015).

Los SIFs son estructuras dinámicas que corresponden a prolongaciones membranosas que irradian desde la SCV, extendiéndose a lo largo de los microtúbulos. Su función aún es investigada, pero la evidencia de una atenuación de la virulencia de una mutante $\Delta sifA$ de *S. Typhimurium*, efector requerido para la formación de SIFs, sugiere una relación entre la formación de estas estructuras y la virulencia de la bacteria (Beuzon et al., 2000). Además, la formación de SIFs en células HeLa infectadas se relaciona con una mayor tasa de replicación intracelular de *S. Typhimurium* (Birmingham et al., 2005). Una hipótesis sobre la función de los SIFs es que permiten a *Salmonella* redireccionar el transporte vesicular del hospedero, permitiendo a la bacteria tener acceso a compuestos endocitados; por ejemplo, nutrientes (Liss et al., 2017). Esto permitiría la replicación intravacuolar y la expansión de los compartimentos membranosos asociados a *Salmonella* (Kuhle et al., 2006; Perrett y Zhou, 2013; D'Costa et al., 2015, Liss et al., 2017). En este sentido, se han detectado vesículas del sistema endosomal marcadas fluorescentemente en el interior de la red de SIFs de células infectadas (Drecktrah et al., 2008; Rajashekar et al., 2008).

Se ha reportado que tanto las membranas como el contenido del lumen de los SIFs se encuentran conectados con la SCV, permitiendo a la bacteria un acceso rápido al material endocitado, fenómeno dependiente del T3SS-2 (Krieger et al., 2014; Liss et al., 2017). También se ha reportado que *S. Typhimurium* es más activa metabólicamente cuando reside dentro de una SCV conectada a la red de SIFs que cuando se encuentra en una SCV sin conexión con dicha red (Liss et al., 2017). En conjunto, esta evidencia sugiere que *S. Typhimurium* manipula el sistema endocítico de la célula hospedera para formar la red de SIFs, utilizándolos para acceder a los

nutrientes y expandir su nicho replicativo. Otra hipótesis propone que la interconectividad de la SCV con los SIFs reduciría la exposición de la bacteria a las enzimas lisosomales adquiridas por la fusión de lisosomas con la SCV (Knuff y Finlay, 2017).

Dentro de los efectores del T3SS-2 que modulan la dinámica de los SIFs, SseJ es uno de los más caracterizados. Esta proteína es codificada por el gen *sseJ* (*STM14_1974*), que está localizado fuera de la SPI-2. SseJ es secretada al medio de cultivo y translocada a través de la membrana del fagosoma mediante el T3SS-2 luego que la bacteria es fagocitada (Yu et al., 2010; Niemann et al., 2011; Yu et al., 2018; Miao y Miller, 2000). Se ha reportado que una mutante $\Delta sseJ$ de *S. Typhimurium* presenta un defecto en la replicación intracelular en macrófagos murinos (Ruiz-Albert et al., 2002; Freeman et al., 2003; Figueira et al., 2013) y es atenuada en ratones (Freeman et al., 2003; Ohlson et al., 2005), por lo que SseJ tendría un papel importante en la supervivencia al interior del hospedero. Este efector presenta múltiples actividades enzimáticas: fosfolipasa A1 (PLA1), desacilasa y glicerofosfolípido:colesterol aciltransferasa (GCAT). A partir de esta última actividad se obtienen lisofosfolípidos y ésteres de colesterol (CEs) como productos, alterando la composición lipídica de la célula hospedera (Ohlson et al., 2005; Lossi et al., 2008; Christen et al., 2009; LaRock et al., 2012, Greene et al., 2021) mediante la movilización de colesterol y la acumulación de *lipid droplets* (LDs) en el citoplasma (Ruiz-Albert et al., 2002; Nawabi et al., 2008; Christen et al., 2009; Greene et al., 2021). El defecto en la virulencia durante la infección en ratones también puede observarse al realizar mutaciones puntuales en los residuos conservados de una tríada catalítica (Ser151,

Asp247 e His384), esencial para las todas las actividades enzimáticas de SseJ. Además, al utilizar esta proteína purificada se ha observado reducción en la formación de CEs en ensayos *in vitro* (Ohlson et al., 2005; Christen et al., 2009).

Ocurrida la translocación de SseJ al citoplasma de la célula hospedera mediante el T3SS-2, el efector se localiza en la cara citoplasmática de la membrana de la SCV y luego se desplaza a través de los SIFs (Freeman et al., 2003). De forma similar, cuando el efector es expresado ectópicamente en células HeLa co-localiza con vesículas endocíticas (Ruiz-Albert et al., 2002; Ohlson et al., 2008). Por otra parte, se ha reportado que mutantes catalíticas de SseJ igualmente se localizan en estos compartimentos membranosos, evidenciando que su localización subcelular es independiente de su actividad enzimática (Ruiz-Albert et al., 2002; Ohlson et al., 2005). La actividad enzimática de SseJ es responsable de la agregación y formación de estructuras membranosas que contienen LAMP-1 en células HeLa transfectadas que producen SseJ (Ruiz-Albert et al., 2002; Ohlson et al., 2008), por lo que este efector estaría implicado en la agregación de vesículas. Además de eso, mediante el uso de sondas fluorescentes se ha evidenciado la acumulación de CEs en el citoplasma de células transfectadas que producen SseJ o infectadas con *S. Typhimurium* (Nawabi et al., 2008; Christen et al., 2009, Greene et al., 2021). Al parecer, la acumulación de CEs asociado a las LDs en el citoplasma se debe a la modificación del contenido de colesterol y fosfolípidos en las membranas, contribuyendo a los cambios morfológicos de los organelos membranosos, tales como el aparato de Golgi y el sistema endosomal (Christen et al., 2009).

Estudios más recientes han reportado que SseJ recluta a la proteína del hospedero OSBP1 a la SCV (Kolodziejek et al., 2019). OSBP1 es un transportador lipídico que media el intercambio de esteroides con fosfatidilinositol 4-fosfato (PI4P) entre el complejo de Golgi y el retículo endoplasmático, siendo de vital importancia para el intercambio lipídico entre los compartimentos membranosos intracelulares. El silenciamiento de OSBP1 durante la infección de células HeLa con *Salmonella* induce la pérdida de la integridad de la membrana de la SCV, produciendo la liberación de la bacteria al citoplasma de la célula hospedera. Esto evidencia el rol crucial de esta proteína para la estabilización de la SCV, por lo que se cree que OSBP1 podría proveer los lípidos necesarios para dicha estabilización (Kolodziejek et al., 2019). Por otra parte, también se ha analizado el rol de SseJ en la interferencia de otras vías del hospedero asociadas con el transporte de lípidos. Se reportó que SseJ se relaciona con la disminución de los niveles del transcrito de *Abca1* en macrófagos (Greene et al., 2021). ABCA1 es un transportador de lípidos que media la translocación de fosfolípidos y colesterol desde el citoplasma al medio extracelular mediante la transferencia de dichos lípidos a las apolipoproteínas durante la síntesis de HDL, por lo que la disminución de este transportador tendría como consecuencia un aumento del colesterol intracelular. Por esta razón, se cree que el mecanismo mediante el cual SseJ induce la acumulación de colesterol es mediante la supresión del transportador ABCA1. Además, este incremento de colesterol en el citoplasma se relaciona con el aumento de la supervivencia intracelular durante la infección de *Salmonella*, evidenciando el importante rol que tiene la manipulación del contenido lipídico del hospedero por parte de la bacteria (Greene et al., 2021). Estos estudios dan luces sobre los mecanismos utilizados por SseJ para la manipulación de los lípidos del hospedero y de la importancia

de esta manipulación durante la infección. A pesar de esto, se desconoce el mecanismo por el cual los lípidos modificados inducen cambios en las membranas, así como la alteración del ambiente de los lípidos y el subsecuente reclutamiento de otras proteínas a las fracciones lipídicas modificadas.

SseJ coopera con SifA, otro efector del T3SS-2, en la regulación de la dinámica de los compartimentos endosomales asociados a *Salmonella* (Ruiz-Albert et al. 2002). Se ha reportado que SifA se localiza en los fagosomas y que es requerido en la formación de SIFs durante la infección de *Salmonella* (Stein et al., 1996; Brumell et al., 2002). Durante la infección de células HEp-2 y macrófagos RAW264.7 con una mutante $\Delta sifA$ de *S. Typhimurium*, la bacteria escapa al citosol y entra en un estado hipereplicativo debido a la ruptura de la membrana de la SCV, aunque la presencia de una delección del gen *sseJ* o de una mutación en la tríada catalítica de esta proteína contrarresta el fenotipo hipereplicativo y la bacteria permanece dentro de la SCV. Esta evidencia sugiere que la pérdida de la integridad de la membrana debido a la ausencia de SifA es dependiente de la actividad enzimática de SseJ y que ambas proteínas participan en la modificación de la membrana de la SCV (Ruiz-Albert et al., 2002; Ohlson et al., 2005). Se podría hipotetizar que la actividad de SseJ cambia las propiedades fisicoquímicas de la membrana de la SCV (por ejemplo, su fluidez), permitiendo la disociación de la SCV de la red microtubular, interacción necesaria para la estabilidad de este compartimento. Se ha reportado que SifA interacciona específicamente con la proteína hospedera SKIP (Ohlson et al., 2008). Esta interacción permite la unión eficiente de la SCV a la red de microtúbulos. Adicionalmente, SifA interacciona preferencialmente con RhoA-GDP (Ohlson et al., 2008). La co-expresión de SifA y SseJ en células HeLa induce

la formación de estructuras tubulares positivas para LAMP-1, similares a los SIFs inducidos por la infección con *Salmonella*. En consecuencia, el modelo actual indica que los efectores SifA y SseJ cooperan en un complejo proteico junto con SKIP y RhoA para promover la formación de SIFs mediante el movimiento de las extensiones membranosas a lo largo de los microtúbulos (Ohlson et al., 2008). Basado en estos resultados, es también tentador especular que estos efectores del T3SS-2 existen en un complejo multiproteico que provoca cambios morfológicos en la célula hospedera (Kolodziejek y Miller, 2015, Knuff-Janzen et al., 2020).

Por otra parte, el efector SseJ se relaciona con un defecto en el tráfico intracelular en levaduras, además de la desestabilización de la red microtubular y la redistribución de organelos endocíticos y lisosomas en células J7744.2 (Raines et al., 2017). El efecto de la expresión de este efector en células NRK (*Normal Rat Kidney*) incluye la redistribución de TGN8 (marcador de trans-Golgi) y la agregación de LGP120 (glicoproteína de la membrana lisosomal), además de la desestabilización de los microtúbulos. Es conocido que la redistribución de estos marcadores y, por lo tanto, de los organelos correspondientes, ocurre cuando existe alguna perturbación de la red microtubular (Matteoni y Kreis, 1987). Este efecto producido por SseJ presenta un fenotipo similar al que produce la adición de un inhibidor de la polimerización de α -tubulina (nocodazol), indicando que existe una perturbación en la red microtubular. También se ha observado una alteración similar en células NRK que expresan SseJ o la mutante catalítica de SseJ, evidenciado mediante la inmunodetección de α -tubulina acoplada a microscopía confocal. Este resultado indica que dicha alteración es independiente de las actividades enzimáticas de SseJ. Por otra parte, también se

observa un efecto sobre la organización de la red microtubular en co-cultivos de la línea celular de macrófagos murinos J774.2 y la cepa 12023 de *S. Typhimurium* (Raines et al., 2017). A pesar de esto, el mecanismo por el cual este efector altera los microtúbulos es desconocido.

1.3.- Interacción de *Salmonella* con protozoos

Si bien *Salmonella* es un patógeno intracelular facultativo, destina una parte importante de su ciclo de vida en el medio ambiente, conviviendo con todo tipo de organismos. Algunos de ellos, como los protozoos, son depredadores que se alimentan de bacterias mediante fagocitosis. Por esto, muchas bacterias han evolucionado generando mecanismos para evitar ser depredadas y sobrevivir dentro de estos organismos, protegiéndose de condiciones adversas del medio ambiente. Como consecuencia, los protozoos actuarían como reservorios y eventuales vectores de transmisión de bacterias patógenas, entre ellas *Salmonella*. El primer reporte de la interacción entre un protozoo y una bacteria data del año 1980, cuando se describió que *Legionella pneumophila* sobrevive y se replica al interior de la ameba *Acanthamoeba polyphaga* (Rowbotham, 1980). Con posterioridad, se comenzó a describir la interacción entre esta bacteria y protozoos. Se descubrió, que *L. pneumophila* utiliza un repertorio de genes similar para sobrevivir intracelularmente en *Acanthamoeba castellanii* y macrófagos humanos (Segal y Shuman, 1999), denotando la importancia de la determinación de los mecanismos moleculares utilizados por los patógenos para relacionarse con los protozoos. Luego, se continuó caracterizando esta interacción en otros modelos y se estableció que bacterias como *Escherichia coli*, *Mycobacterium avium*, *Chlamydia pneumonia*, *Listeria monocytogenes*, *Burkholderia*

cepacia y *Pseudomonas aeruginosa*, entre otras, presentan la capacidad de sobrevivir y replicarse al interior de protozoos de los géneros *Acanthamoeba* y *Tetrahymena* (Ly y Muller, 1990; Essig et al., 1997; Barker et al., 1999; Cirillo et al., 1999; Marolda et al., 1999). Se cree que los protozoos servirían como reservorios o vectores de transmisión de bacterias patógenas a humanos u otros animales, actuando como “caballos de Troya” (Lorenzo-Morales et al., 2007; Thomas y Greub, 2010; Anacarso et al., 2012; Mella et al. 2016), además de ser “cunas evolutivas” que permitirían el desarrollo de nuevos mecanismos de virulencia por parte de las bacterias, por lo que son importantes para la adaptación de las éstas al interior de organismos eucarióticos superiores. Esto último podría explicar la adaptación que le permitiría a algunas bacterias sobrevivir en macrófagos (Harb et al., 2000; Albert-Weissenberger et al., 2007; Huws et al., 2008; Kebbi-Beghdadi y Greub, 2014) o el hecho que *L. pneumophila* recuperadas desde *Acanthamoeba castellanii* posean una mayor virulencia en ratones (Cirillo et al., 1999).

La investigación de la interacción *Salmonella*-protozoos comenzó cuando se reportó que *S. Typhimurium* es capaz de sobrevivir y replicarse dentro de vesículas contráctiles al interior de *Acanthamoeba polyphaga* (Gaze et al., 2003). Esta observación sugiere que la supervivencia de *Salmonella* dentro de protozoos ambientales podría ser de vital importancia durante el ciclo de vida de la bacteria en el medio ambiente. Posteriormente, distintos estudios han establecido que algunos serovares de *Salmonella* tienen la capacidad de sobrevivir en distintas especies de protozoos de los géneros *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Tetramitus*, *Hartmanella* y *Tetrahymena* (Tezcan-Merdol et al., 2004; Wildschutte et al., 2004; Brandl et al., 2005;

Wildschutte y Lawrence, 2007; Bleasdale et al., 2009; Feng et al., 2009; Rehfuss et al., 2011). Por ejemplo, *S. enterica* serovar Thompson escapa de la depredación de protozoos de la especie *Tetrahymena* mediante su compartimentalización dentro del citoplasma hospedero, protegiendo a la bacteria de agentes tóxicos como el hipoclorito (Brandl et al., 2005). *S. Dublin* puede replicarse al interior de *A. rhysodes*, fenómeno dependiente del plasmidio de virulencia de *Salmonella* (SVP) y de HilA, factor transcripcional que regula la expresión de la SPI-1 (Tezcan-Merdol et al., 2004). Por otra parte, también se ha reportado que algunos protozoos depredadores como *Naelgeria* y *Acanthamoeba* tienen la capacidad de distinguir y preferir algunos serovares de *Salmonella* a través del reconocimiento de su antígeno-O (Wildschutte et al., 2004). También se ha reportado que *S. enterica* serovar Thompson sobrevive al interior de *Tetrahymena pyriformis* y en ciliados del género *Glaucoma* (Gourabathini et al., 2008).

Con respecto a los T3SS y a sus efectores, un estudio determinó el aporte de SPI-1, SPI-2 y el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ (el cual regula la expresión de SPI-2 y otros genes de virulencia) en la supervivencia de *S. Typhimurium* en *A. polyphaga*. Los resultados indican que la bacteria requiere a PhoP/PhoQ y a la SPI-2 para su supervivencia, no así a la SPI-1 (Bleasdale et al., 2009). También se evidenció que la transcripción de los genes *sipC* y *sseC* (codificados en SPI-1 y SPI-2, respectivamente) es activada luego de la infección de *A. polyphaga* con *S. Typhimurium*. Bajo las mismas condiciones de infección, se observó un aumento radical en la transcripción de *sseC* pasadas 4 h de infección. Esto indica que la proteína codificada en este gen estaría implicada en la supervivencia intracelular de

S. Typhimurium en *A. polyphaga* (Bleasdale et al., 2009). De la misma forma, los genes *sifB* y *sopB*, entre otros genes importantes para la biogénesis de la SCV, se inducen durante la infección de *Tetrahymena* con *S. Typhimurium* (Rehfuss et al., 2011). Estos descubrimientos sugieren que *Salmonella* utiliza un repertorio de genes similar para infectar hospederos animales y protistas, aunque aún falta esclarecer los mecanismos moleculares por los cuales *Salmonella* y otras bacterias sobreviven al interior de protozoos, además del rol que tendrían los efectores secretados por T3SS-1 y T3SS-2.

1.4.- *Dictyostelium discoideum*: un nuevo modelo de estudio para la interacción bacteria-protocista

La ameba social *Dictyostelium discoideum* ha sido utilizada durante décadas como organismo modelo para la caracterización de procesos celulares llevados a cabo por células eucariontes, tales como la fagocitosis, motilidad celular, quimiotaxia y vías de transducción de señales (Duhon y Cardelli, 2002; Bozzaro y Eichinger, 2011). Este organismo habita en suelos de áreas boscosas, donde se desarrolla en estado unicelular si es que existe disponibilidad de bacterias para alimentarse. Frente a la escasez de alimentos, las amebas en estado unicelular comienzan a agregarse y a diferenciarse en distintos tejidos, conformando un organismo pluricelular (Eichinger, 2003). En años más recientes, *D. discoideum* ha sido utilizado como modelo para el estudio de la interacción patógeno-hospedero con diversas bacterias patógenas (Steinert, 2011). Su uso como modelo se debe a que el cultivo de *Dictyostelium* en el laboratorio resulta relativamente sencillo y a que este organismo es idóneo para estudios mediante técnicas de biología celular, genética y bioquímica. Además, su genoma se encuentra secuenciado y disponible para la investigación (Bozzaro y Eichinger, 2011). También

existe la base de datos dictyBase (<http://dictybase.org>), donde se encuentra información general sobre *Dictyostelium*, como su genoma, rutas metabólicas y protocolos, además de una gran variedad de recursos y cepas disponibles para la comunidad científica.

Entre los primeros estudios que se realizaron para caracterizar la interacción de *Salmonella* con *D. discoideum*, se reportó que *S. Typhimurium* no era capaz de sobrevivir al interior de la ameba luego de ser fagocitada (Skiwan et al., 2002). Posteriormente, se observó que mutaciones en genes fundamentales para la autofagia en *D. discoideum* permitían la supervivencia de *S. Typhimurium* en la ameba, evidenciando que la supervivencia de esta bacteria está condicionada por la vía autofágica de esta ameba (Jia et al., 2009). Tiempo después, se determinó que *S. Typhimurium* altera el desarrollo social de *D. discoideum*, impidiendo la formación de cuerpos fructíferos, mediante un mecanismo dependiente del T3SS-2 (Sillo et al., 2011). Además, se reportó que *S. Typhimurium* sobrevive al interior de la ameba durante al menos 6 h (Frederiksen y Leisner, 2015). uno de los aportes que ha realizado nuestro grupo de investigación en la comprensión de la interacción de *D. discoideum* con *S. Typhimurium* es la determinación de la residencia de la bacteria dentro de estructuras vacuolares al interior de la ameba luego de su internalización (Valenzuela et al., 2020) y el requerimiento de T3SS-1 y T3SS-2 para permitir la supervivencia intracelular del patógeno en esta ameba (Riquelme et al., 2016). Recientemente, nuestro grupo evaluó la importancia de distintos efectores de los T3SS en la supervivencia de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*, siendo relevantes los efectores SopB, SopF y SipA, secretados por el T3SS-1, y los efectores SifA, SseG y SseF,

secretados por el T3SS-2 (Valenzuela et al., 2020; Vera, 2020; Ortega, 2021). Esto evidencia que tanto los T3SS como sus efectores cumplen un papel fundamental en la evasión de la fagocitosis y la supervivencia intracelular de *Salmonella* en *D. discoideum*.

Teniendo en cuenta los antecedentes presentados, el trabajo propuesto tuvo como objetivo investigar el papel del efector SseJ, tanto en la supervivencia de *S. Typhimurium* dentro de la ameba *D. discoideum*, así como la caracterización de la secreción de este efector al citoplasma de la ameba. Se espera que los datos obtenidos a partir de esta tesis permitan una mayor comprensión de los factores que permiten la supervivencia de *Salmonella* en *D. discoideum*. Esto contribuiría al entendimiento de la interacción patógeno-hospedero en amebas, permitiendo un eventual desarrollo de nuevas estrategias para el control de infecciones producidas por *Salmonella* y otras bacterias de importancia en la salud pública.

2.- HIPÓTESIS

“El efector SseJ de *Salmonella* Typhimurium es producido y translocado al citoplasma de *Dictyostelium discoideum* y es requerido para la supervivencia intracelular de la bacteria en esta ameba”.

3.- OBJETIVO GENERAL

Determinar si el efector SseJ de *Salmonella* Typhimurium es producido y translocado al citoplasma de *Dictyostelium discoideum* y si es requerido para la supervivencia intracelular de la bacteria en esta ameba.

4.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar si el efector SseJ de *Salmonella* Typhimurium es producido al interior de *Dictyostelium discoideum*.
2. Determinar si el efector SseJ de *Salmonella* Typhimurium es translocado al citoplasma de *Dictyostelium discoideum*.
3. Determinar si el efector SseJ es requerido para la supervivencia intracelular de *Salmonella* Typhimurium en *Dictyostelium discoideum*.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Reactivos

A continuación, se listan los proveedores y los insumos adquiridos para el desarrollo de esta tesis.

- **Abcam (MA, EEUU):** anticuerpo primario anti-DnaK ([8E2/2] ab69617).
- **Bio-Rad, Inc (CA, EEUU):** solución 40% acrilamida/bis-acrilamida, Laemmli Sample Buffer 4x, buffer tris/glicina 10x, sistema de electroforesis en geles “*Mini-Protean III*”, sistema de transferencia “*Mini Trans-Blot*”, electroporador “*E. coli Pulser*”.
- **Biotium (CA, EEUU):** *GelRed*.
- **Becton, Dickinson and Company (MD, EEUU):** Bacto agar.
- **Cell Signaling Technology, Inc (MA, EEUU):** anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (HRP).
- **Corning (NY, EEUU):** PBS 1x, botellas de cultivo celular T25, botellas de cultivo celular T50, sistema de filtrado al vacío.
- **Difco Laboratories (MI, EEUU):** triptona, extracto de levadura, casaminoácidos
- **Gibco (NY, CA):** azul de tripán.
- **IDT (IO, EEUU):** Oligonucleótidos partidores para PCR.
- **Invitrogen Life Technology (CA, EEUU):** *Taq* DNA polimerasa, agarosa ultrapura.
- **Merck (NJ, EEUU):** Cloruro de sodio (NaCl), sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), glucosa, cloroformo ($CHCl_3$), cloruro de potasio (KCl), cloruro de magnesio hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), glicerol, ácido clorhídrico fumante

(HCl), isopropanol, ácido acético glacial (CH₃COOH), hidróxido de sodio (NaOH), EtOH (CH₃CH₂OH), fosfato monoácido de potasio trihidratado (K₂HPO₄×3H₂O), fosfato diácido de potasio (KH₂PO₄), fosfato monoácido de sodio (Na₂HPO₄), sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄), MetOH (CH₃OH), acetona (CH₃COCH₃), N,N,N',N'-Tetrametiletilenamida (Temed), Triton X-100, solución amortiguadora TAE 50x y filtros Millipore de 0,22 µm y de 0,025 µm.

- **New England Biolabs (MA, EEUU):** estándar de peso molecular de DNA de 1 Kb para electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa, enzimas de restricción *Xho*I y *Xba*I, Gel Loading Dye 6x.
- **Promega (MA, EEUU):** “*Go Taq Green Master Mix*”, desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) para PCR, *LigaFast Rapid DNA Ligation System*, pGEM-T Easy Vector Systems.
- **Qiagen (CA, EEUU):** sistema de purificación de productos de PCR “*QIAquick PCR purification*”, sistema de extracción de DNA plasmidial “*QIAprep Spin Miniprep*”, sistemas de extracción de DNA plasmidial “*Qiagen Plasmid Maxi Kit*” y “*QIAprep Spin Miniprep Kit*” y sistema de extracción desde geles de agarosa “*QIAquick Gel Extraction Kit*”.
- **Santa Cruz Biotechnology, Inc (CO, EEUU):** anticuerpo primario anti-CyaA' (sc-13582).
- **Sigma-Aldrich Co. (MA, EEUU):** Kanamicina, ampicilina, gentamicina, estreptomina, cloranfenicol, L-arabinosa, BSA, persulfato de amonio (APS), ácido tricloroacético (TCA), ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), β-mercaptoetanol, Tween-20 y sistema para extracción de DNA genómico “*GenElute Bacterial Genomic DNA Kit*”.

- **US Biological (MA, EEUU):** isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).
- **Thermo Scientific (MA, EEUU):** estándar de peso molecular de proteínas *PageRuler*, Coomassie Brilliant Blue G-250 y reactivo para revelado “*Supersignal West-Femto*”.

5.2.- Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas en esta tesis se indican en la **Tabla 1**.

Tabla 1.- Cepas bacterianas utilizadas en esta tesis

<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium		
Cepa	Genotipo	Fuente
14028s	Cepa silvestre virulenta	Cepario laboratorio
$\Delta sseJ$	$\Delta sseJ::Kan$	Este trabajo
$\Delta aroA$	$\Delta aroA::Kan$	Cepario laboratorio
$\Delta invA$	$\Delta invA::Kan$	Cepario laboratorio
$\Delta ssaD$	$\Delta ssaD::Kan$	Cepario laboratorio
pMMB207:: <i>pphB-cyaA'</i>	pMMB207:: <i>pphB-cyaA'</i>	Cepario laboratorio
pMMB207:: <i>sseJ-cyaA'</i>	pMMB207:: <i>sseJ-cyaA'</i>	Este trabajo
$\Delta invA/pMMB207::sseJ-cyaA'$	$\Delta invA::Kan / pMMB207::sseJ-cyaA'$	Este trabajo
$\Delta ssaD/pMMB207::sseJ-cyaA'$	$\Delta ssaD::Kan / pMMB207::sseJ-cyaA'$	Este trabajo
<i>sseJ_cyaA'</i> -Kan	<i>sseJ::cyaA'</i> -Kan	Cepario laboratorio
<i>sseJ_cyaA'</i> -FRT	<i>sseJ::cyaA'</i> -FRT	Este trabajo
$\Delta invA sseJ_cyaA'$ -FRT	$\Delta invA/sseJ::cyaA'$ -FRT	Este trabajo
$\Delta ssaD sseJ_cyaA'$ -FRT	$\Delta ssaD/sseJ::cyaA'$ -FRT	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
Cepa	Genotipo	Fuente
DH5α/pGEM-T:: <i>sseJ</i>	Cepa DH5α transformada con pGEM-T:: <i>sseJ</i>	Este trabajo
TOP10/pMMB207:: <i>pphB-cyaA'</i>	Cepa TOP10 transformada con pMMB207:: <i>pphB-cyaA'</i>	Cepario laboratorio
DH5α/pMMB207:: <i>sseJ-cyaA'</i>	Cepa DH5α transformada con pMMB207:: <i>sseJ-cyaA'</i>	Este trabajo
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
Cepa	Genotipo	Fuente
DBS0305928	Cepa silvestre	DictyBase

5.3.- Plasmidios

Los plasmidios utilizados en esta tesis se muestran en la **Tabla 2.**

Tabla 2.- Listado de plasmidios utilizados en esta tesis

Plasmidio	Descripción	Origen
pGEM®-T Easy	Amp ^R	Invitrogen
pGEM-T::sseJ	Amp ^R	Este trabajo
pMMB207::pphB-cyaA'	Cam ^R	Stock laboratorio
pMMB207::sseJ-cyaA'	Cam ^R	Este trabajo
pKD46	<i>bla</i> P _{BAD} <i>gam bet exo ori</i> RpSC101, Amp ^R (GenBank AY048746)	Datsenko y Wanner, 2000
pCLF4	<i>bla</i> FRT <i>aph</i> FRT PS1 PS2 <i>oriR6Ky</i> , Amp ^R , Kan ^R , P _{T7} (GenBank EU629214)	Santiviago et al., 2009
pCyaA'-Kan	<i>bla</i> PC1 <i>cyaA'</i> FRT <i>aph</i> FRT PC2 <i>oriR6Ky</i> , Amp ^R , Kan ^R , P _{T7}	Fernández et al., 2021
pCP20	<i>bla cat cl857 l_{PR} flp, ori</i> RpSC101, Amp ^R , Cam ^R	Datsenko y Wanner, 2000

5.4.- Partidores

Los oligonucleótidos partidores utilizados en esta tesis se presentan en la

Tabla 3.

Tabla 3.- Listado de oligonucleótidos partidores utilizados en esta tesis

Partidores	Secuencia (5'→3')
sseJ_out5	CTCACGCCAGCACACTAAAA
sseJ_out3	ATCGGCAGCAAAGATAGCAT
sseJ_H1+P1	GGAGGACACTATGCCATTGAGTGTGGACAGGGTTATTTTCGTGCAGGCTGGAGCTGCTTC
sseJ_H2+P2	CGATGGAACCTTTATTCAGTGGAAATAATGATGAGCTATAAACATATGAATATCCTCCTTAG
sseJ_CyaA_XbaI	GCTCTAGAAAATAAAGTAAGGAGGACACTATGCCATTGAGTGTGGACA
sseJ_CyaA_XhoI	CCGCTCGAGTTCAGTGGAAATAATGATGAGCTATAAACTTTCTAACATT
invA_out5	TGAGGGTTTCGCTATTAACCG
invA_out3	TGGCAATGCAAATAAATCCA
ssaD_out5	CGGTGGTGCTAGTGGTTTTT
ssaD_out3	GATATTGCTGCGGATCCTGT
pMMB207_Fw	TGGAATTGTGAGCGGATAAC
pMMB207_Rv	TTCTCTCATCCGCCAAAACA
Sp6	ATTTAGGTGACACTATAG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG

5.5.- Medios y condiciones de cultivo bacteriano

El cultivo rutinario de las cepas bacterianas se realizó en caldo Luria Bertani (LB, 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl) a 37°C con agitación. El medio de cultivo fue suplementado con Kanamicina (Kan, 75 µg/mL), ampicilina (Amp, 100 µg/mL) o cloranfenicol (Cam, 20 µg/mL) cuando fue requerido. El caldo LB se suplementó con Bacto agar (15 g/L) para la preparación de medios de cultivo sólido.

5.6.- Cepas, medios y condiciones de cultivo de *D. discoideum*

En este trabajo se utilizó como cepa silvestre la línea celular axénica AX4 (DBS0302402) de *D. discoideum*, obtenida desde el Dicty Stock Center.

Las cepas de *D. discoideum* se cultivaron inicialmente a 23°C sobre un césped de *K. pneumoniae* DBS0305928 sembrado en placas de agar SM (10 g/L glucosa, 10 g/L de peptona, 1 g/L de extracto de levadura, 1 g/L de MgSO₄·7H₂O, 1,9 g/L de KH₂PO₄, 0,6 g/L de K₂HPO₄, 20 g/L de Bacto agar, pH 6,4) y tratado con radiación UV durante 10 min. Luego se tomaron amebas obtenidas a partir de las placas de fagocitosis encontradas en el agar SM y se cultivaron en condiciones axénicas con agitación a 23°C en medio líquido HL5 (14 g/L de triptona, 7 g/L de extracto de levadura, 0,35 g/L de Na₂HPO₄, 1,2 g/L de KH₂PO₄, pH 6,3) suplementado con glucosa (14 g/L), Str (300 µg/mL) y Amp (100 µg/mL). A partir del primer subcultivo, las amebas se cultivaron en medio HL5 suplementado con glucosa y Amp (100 µg/mL). Alternativamente, las amebas tomadas desde las placas de fagocitosis fueron cultivadas en las mismas condiciones, pero sin agitación. La viabilidad de las amebas se determinó mediante tinción con azul de tripán y posterior recuento en cámara de Neubauer. Todos los subcultivos se realizaron con células en fase exponencial temprana

($1-2 \times 10^6$ células/mL) o habiendo alcanzado una confluencia de 95-100%. Para los ensayos de translocación y supervivencia siempre se utilizaron células provenientes del 3^{er} al 6^{to} subcultivo.

5.7.- Construcción de fusiones génicas plasmidiales a reportero CyaA'

Para evaluar la secreción del efector SseJ en cultivos *in vitro*, se generó una cepa de *S. Typhimurium* 14028s portadora del plasmidio pMMB207::*sseJ-cyaA'*, el cual permite la expresión de una proteína de fusión que se compone del efector SseJ y el dominio catalítico de CyaA, toxina de *Bordetella pertussis* que exhibe actividad adenilato ciclasa en presencia de calmodulina. Debido a que calmodulina es una proteína presente exclusivamente en el citoplasma de células eucariontes, el uso de este dominio puede ser útil como reportero para evaluar la translocación de una proteína al citoplasma de un hospedero eucarionte (Sory et al., 1995), mediante la cuantificación de los niveles de AMPc, que resultan de su actividad adenilato ciclasa. Adicionalmente, este dominio puede ser detectado mediante *western blot*.

5.7.1.- Extracción de DNA genómico

La extracción del DNA genómico (gDNA) de *S. Typhimurium* 14028s se llevó a cabo empleando el sistema comercial "*GenElute Bacterial Genomic DNA Kit*", de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las bacterias se cultivaron en medio LB a 37°C con agitación durante al menos 12 h. La elución final del DNA realizó con 50 µL de H₂O libre de nucleasas y luego se almacenó una fracción a -20°C y otra a 4°C hasta su uso.

5.7.2.- Obtención de productos de PCR del gen *sseJ*

Para este fin se amplificó el marco de lectura del gen *sseJ* desde el gDNA de *S. Typhimurium* utilizando los partidores *sseJ_CyaA_XbaI* y *sseJ_CyaA_XhoI*, con los cuales se introdujeron sitios de restricción para las enzimas *XhoI* y *XbaI*. Para generar la fusión traduccional a *CyaA'* dentro del marco de lectura, el partidor *sseJ_CyaA_XhoI* presenta complementaridad de bases con la región inmediatamente río arriba del codón de término del gen *sseJ*. La amplificación se realizó en las condiciones descritas a continuación:

Reactivo	Volumen (µL)	Concentración final
H ₂ O libre de nucleasas	39	-
Buffer Taq (10x)	5	1x
MgCl ₂ (50 mM)	1,5	1,5 mM
<i>sseJ_CyaA_5'</i> (10 µM)	1	0,2 µM
<i>sseJ_CyaA_3'</i> (10 µM)	1	0,2 µM
dNTPs (10 mM)	1	0,2 mM
gDNA (2,4 µg/mL)	1	48 ng/mL
Taq Polimerasa (5 U/µL)	0,5	
Volumen final	50 µL	

Programa de PCR		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
93 °C	5 min	30
95 °C	30 seg	
60 °C	30 seg	
72 °C	2 min 10 s	
72 °C	10 min	
20 °C	∞	

5.7.3.- Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Previo a la corrida electroforética, el producto de PCR se mezcló con tampón de carga para ácidos nucleicos 4x. Luego, el amplicón se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en solución amortiguadora TAE 1x y la corrida electroforética se efectuó a 100 V durante 30 min. EL gel se tiñó con *GelRed*, se visualizó en un transiluminador UV y se tomó una foto de los resultados con el sistema de fotodocumentación “*microDOC*”. Luego de la confirmación de la obtención de los productos de PCR esperados, se purificaron mediante el sistema comercial “*QIAquick PCR Purification Kit*”, de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

5.7.4.- Clonamiento en vector comercial pGEM-T Easy

El fragmento obtenido se insertó en el vector comercial pGEM-T Easy, utilizando los reactivos proveídos por el fabricante y la siguiente composición de la reacción:

Reactivo	Volumen (μL)
2x Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	7,5
pGEM®-T Easy Vector (50 ng/ μL)	1
Producto de PCR purificado	5
DNA ligasa del fago T4 (3 U Weiss/ μL)	1
H ₂ O libre de nucleasas	0,5
Volumen final	15

La reacción se dejó a temperatura ambiente durante aproximadamente 16 h. Posteriormente se incubó a 65°C durante 10 min para inactivar a la enzima.

5.7.5.- Obtención de *E. coli* DH5 α electrocompetentes y transformación con el plasmidio pGEM-T::*sseJ*

Previo a la transformación, los productos de ligación se dializaron en agua libre de nucleasas usando una membrana con poros de 0,025 μm de diámetro y se recuperó el volumen luego de al menos 20 min. Para la transformación del plasmidio pGEM-T::*sseJ* por electroporación, se cultivó *E. coli* DH5 α en caldo LB a 37°C y con agitación durante 16 h aproximadamente. Al día siguiente se realizó una dilución de 1:100 del cultivo en caldo LB con volumen final de 20 mL y se incubó en iguales condiciones hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0,4-0,6. Las bacterias se sedimentaron a 3240 x g durante 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 15 mL de H₂O libre de nucleasas fría, volviendo a centrifugar en las mismas condiciones, proceso que se repitió dos veces más, completando un total de 3 lavados. Luego del último lavado se descartó el sobrenadante por inversión, se resuspendió el sedimento en el líquido remanente del tubo y se recuperaron 80 μL , los cuales se mezclaron con

10 µL del producto de ligación dializado. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación, se le aplicó un pulso de 1,8 KV e inmediatamente se agregó 1 mL de caldo LB y se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación. Finalmente, las bacterias se sembraron en placas de agar LB suplementado con Amp (100 µg/mL), las que se incubaron durante 16 h para seleccionar las bacterias transformantes.

5.7.6.- Confirmación de la adquisición del pGEM-T::*sseJ* mediante PCR de colonias

Para confirmar la incorporación del plasmidio en *E. coli* DH5α se suspendieron las colonias obtenidas en 100 µL de H₂O libre de nucleasas, suspensión que se utilizó como templado para la PCR. Para la amplificación se utilizaron los partidores SP6 y T7, los cuales hibridan río arriba y río abajo del inserto clonado en el vector. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Reactivo	Volumen (µL)	Concentración final
H ₂ O libre de nucleasas	11	-
Buffer Taq (5x)	4	1x
MgCl ₂ (25 mM)	1,6	2 mM
SP6 (10 µM)	0,4	0,2 µM
T7 (10 µM)	0,4	0,2 µM
dNTPs (10 mM)	0,4	0,2 mM
gDNA (2,4 µg/mL)	2	240 ng/mL
GoTaq Polimerasa (5 U/µL)	0,2	
Volumen final	20 µL	

Programa de PCR		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	10 min	30
95°C	30 seg	
50°C	30 seg	
72°C	2 min	
72°C	10 min	
12°C	∞	

5.7.7.- Extracción de los plasmidios

Con la finalidad de obtener el inserto *sseJ* y el esqueleto del pMMB207::*cyaA*’, los plasmidios pGEM-T::*sseJ* y pMMB207::*pphB-cyaA*’ se purificaron a partir de su cepa

portadora utilizando el sistema comercial “QJAGEN Plasmid Maxi Kit” (Maxiprep), según las instrucciones del fabricante.

5.7.8.- Digestión mixta y purificación desde gel de agarosa preparativo para obtención de inserto de vector de expresión

Los plasmidios de interés previamente purificados fueron digeridos enzimáticamente utilizando las enzimas de restricción *XhoI* y *XbaI* en la misma reacción, utilizando la siguiente fórmula:

Para pGEM-T::sseJ:

Reactivo	Volumen (µL)
Buffer CutSmart 10x	2
pGEM-T::sseJ	5
<i>XhoI</i> (20 U/µL)	1
<i>XbaI</i> (20 U/µL)	1
H ₂ O libre de nucleasas	11
Volumen final	20

Para pMMB207::pphB-cyaA’:

Reactivo	Volumen (µL)
Buffer CutSmart 10x	2
pMMB207::pphB-cyaA’	10
<i>XhoI</i> (20 U/µL)	1
<i>XbaI</i> (20 U/µL)	1
H ₂ O libre de nucleasas	6
Volumen final	20

Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente durante 16 h aproximadamente y al día siguiente se detuvieron incubándolas a 65° C durante 10 min. Los productos de digestión fueron analizados mediante un gel de agarosa al 0,8%. Para la purificación del producto de digestión, se preparó un gel de agarosa preparativo al

1% con *GelRed*. Para la electroforesis, se cargó todo el volumen de cada reacción previamente mezclado con un volumen de tampón de carga 2x para ácidos nucleicos. Luego de la corrida electroforética a 100 v durante 45 min, el gel se visualizó en un transiluminador UV y se cortó la banda deseada con un bisturí. El DNA se extrajo desde el gel con el sistema comercial “*QIAquick Gel Extraction Kit*” y se eluyó con 50 µL de H₂O libre de nucleasas.

5.7.9.- Ligación a vector pMMB207::*cyaA*'

Luego de obtener el inserto extraído desde el pGEM-T::*sseJ* y el esqueleto del pMMB207::*cyaA*', se construyó el pMMB207::*sseJ-cyaA*' mediante la ligación de ambas secuencias con la DNA ligasa del fago T4 según la siguiente reacción:

Reactivo	Volumen (µL)
2X Rapid Ligation Buffer	20
Plasmidio	6
Inserto	12
DNA ligasa del fago T4 (3 U Weiss/µL)	2
Volumen final	40

Las reacciones se dejaron durante 16 h a temperatura ambiente y se detuvieron incubándolas a 65° C durante 10 min.

5.7.10.- Obtención de *S. Typhimurium* electrocompetentes y transformación con el plasmidio pMMB207::*sseJ-cyaA*'

Para la transformación del plasmidio pMMB207::*sseJ-cyaA*' por electroporación se utilizó el mismo procedimiento que en la Sección 5.7.5, con algunas modificaciones. En el caso de la transformación de las cepas $\Delta invA$ y $\Delta ssaD$, el medio de cultivo LB se suplementó con Kan y la siembra de las bacterias obtenidas se realizó en placas de agar LB suplementado con Cam o Cam/Kan.

5.8.- Secreción de la proteína SseJ-CyaA' expresada desde una fusión plasmidial *in vitro* mediante *western blot*

Con la finalidad de evaluar la secreción de la proteína de fusión al medio de cultivo, se realizaron cultivos de la cepa silvestre de *S. Typhimurium* 14028s y de cepas mutantes portadoras del plasmidio pMMB207::*sseJ-cyaA'* que expresa la proteína de fusión SseJ-CyaA': pMMB207::*sseJ-cyaA'*, $\Delta invA$ /pMMB207::*sseJ-cyaA'* y $\Delta ssaD$ /pMMB207::*sseJ-cyaA'*. La detección de la proteína de fusión SseJ-CyaA' se realizó en sobrenadantes y sedimentos de los cultivos bacterianos (Figura 5).

5.8.1.- Preparación de muestras de lisados bacterianos para detección de proteínas por electroforesis

Se cultivaron las cepas en medio LB suplementado o no con Cam a 37°C con agitación durante 16 h aproximadamente. Posteriormente, de cada cultivo se realizaron dos diluciones 1:100 en medio LB con un volumen final de 20 mL y se incubaron en las mismas condiciones durante 3 h. Transcurrido el tiempo se indujo la expresión de la proteína de fusión en uno de los cultivos de cada cepa mediante la adición de IPTG (concentración final 10 μ M) y se cultivaron durante dos horas más en las mismas condiciones. Luego, se sedimentaron las bacterias de todos los cultivos realizados mediante centrifugación a 3420 x g durante 30 min a 4°C y se reservaron los sobrenadantes. Cada sedimento fue resuspendido en 5 mL de PBS, ajustando la concentración hasta obtener una $OD_{600nm} = 2$. El volumen calculado se centrifugó a 18300 x g durante 3 min, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 1 mL de PBS 1x. Se tomaron 75 μ L de la suspensión bacteriana y se mezclaron con 25 μ L de tampón Laemmli 4x con β -mercaptoetanol (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, SDS 2%,

glicerol 10%, azul de bromofenol 0,01% y β -mercaptoetanol 4%). Finalmente, los lisados se hirieron durante 10 min a 100 °C y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

5.8.2.- Análisis mediante SDS-PAGE

Las proteínas presentes en las muestras de lisados bacterianos se separaron por su masa molecular en geles de poliacrilamida desnaturantes. Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida (12%) para SDS-PAGE y se corrieron en tampón de corrida 1x (glicina 1,44%, Tris 0,3%, SDS 0,1%) a 60v durante una hora, para posteriormente aumentar el voltaje a 120v constantes durante 4 h. Para la visualización de proteínas mediante tinción con azul de *Coomassie* se incubaron los geles a temperatura ambiente con agitación durante 1 hora en una solución de azul de *Coomassie* (1 g de *Coomassie Brilliant Blue* G-20 (Thermo) disuelta en una disolución de MetOH 50% v/v, ácido acético glacial 10% v/v y H₂O 40% v/v). El desteñido de los geles se realizó mediante 3 lavados con H₂O destilada a temperatura ambiente con agitación durante 5 min y la posterior incubación de los geles en una solución de ácido acético glacial 5% v/v a temperatura ambiente sin agitación durante 16 h.

5.8.3.- Inmunodetección de la proteína de fusión SseJ-CyaA' mediante *western blot*

Con la finalidad de detectar la proteína de fusión SseJ-CyaA' las muestras obtenidas se sometieron a *western blot* en el sistema de electroforesis en geles *Mini-Protean III* (Bio-Rad). La transferencia se realizó mediante electrotransferencia húmeda en el sistema *Mini Trans-Blot* (Bio-Rad), a una membrana de PVDF previamente activada con MetOH 100% (Inmovilion-P, Millipore), en tampón de transferencia (glicina 1,44%, Tris 0,3% y MetOH 20%) a 300 mA constantes y temperatura ambiente durante 1,5 h. Finalizada la transferencia, la membrana se lavó durante 5 min en TBS-T

(Tris-Base 0,5 M, NaCl 1,5 M, Tween-20 0,1%) y se procedió al bloqueo con una solución de BSA 5% (Sigma-Aldrich) en TBS-T durante una hora a temperatura ambiente y con agitación. La membrana se lavó 3 veces con TBS-T durante 10 min a temperatura ambiente y con agitación. Posteriormente la membrana se incubó en el anticuerpo primario en dilución 1:10000 preparado en solución de bloqueo, fuera este anti-CyaA' (Santa Cruz Biotechnology, Inc) o anti-DnaK (Abcam), durante toda la noche, a 4 °C y sin agitación. Al día siguiente la membrana se lavó 3 veces con TBS-T durante 15 min a temperatura ambiente y se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (HRP, Cell Signaling Technology, Inc) en dilución 1:20000 preparada en solución de bloqueo durante 3 h a temperatura ambiente con agitación. Pasado el tiempo de incubación, se lavó la membrana 3 veces con TBS-T con agitación durante 15 min.

El revelado se llevó a cabo con el sistema comercial *Supersignal West-Femto* (Pierce Biotechnology, Inc), reactivo que al ser oxidado por la HRP emite una señal quimioluminiscente. La membrana se incubó con 1 mL de la mezcla proveída durante un minuto y se utilizó el equipo *Dyversity 4* para registrar la señal quimioluminiscente y obtener imágenes.

5.8.4.- Preparación de muestras de sobrenadantes de cultivos bacterianos para *western blot*

Los sobrenadantes de cultivo almacenados (Sección 5.8.1) fueron filtrados con filtros con poros de 0,22 µm de tamaño de poro, Luego, se adicionó TCA (Sigma-Aldrich, 10% final) y se incubó a 4 °C durante 16 h para precipitar las proteínas.

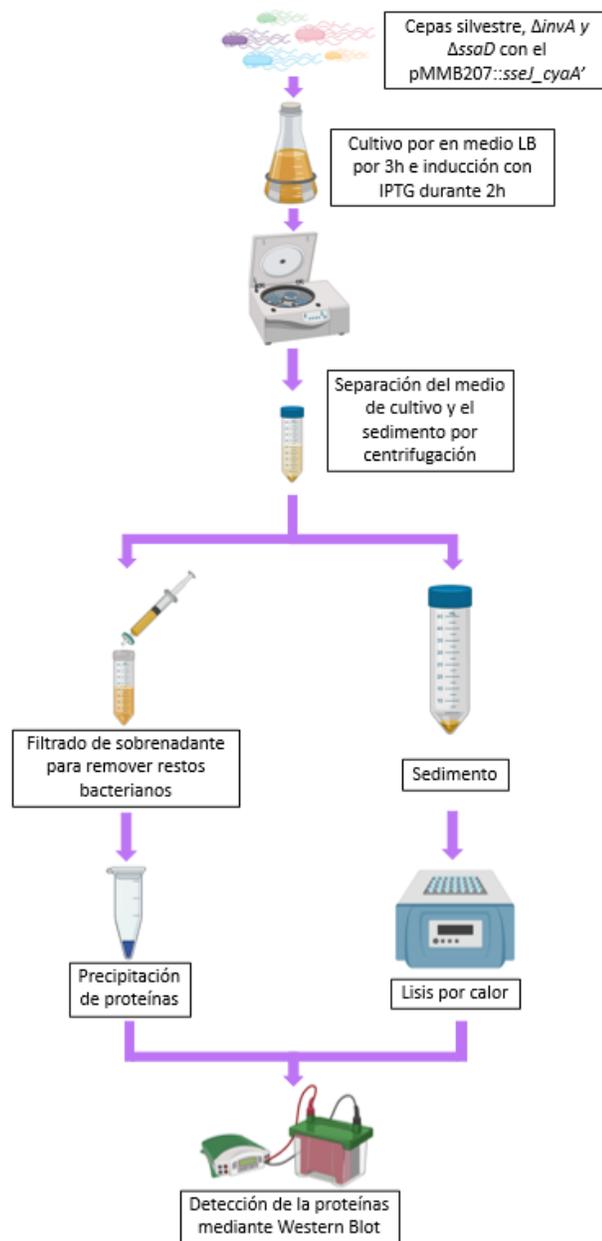


Figura 5.- Ensayo de secreción del efector *SseJ* de *Salmonella* al medio de cultivo. Las cepas portadoras del plasmidio pMMB207::*sseJ-cyaA*⁺, con fondo genético silvestre y con deleciones en los genes *invA* y *ssaD*, se cultivaron en caldo LB durante 3 h. Se indujo la expresión de la proteína de fusión con IPTG y se incubaron durante 2 h más. Los cultivos se centrifugaron y se separó el sedimento bacteriano de los sobrenadantes. El sedimento se trató con calor para lisar las bacterias y permitir la liberación de las proteínas intracelulares. Los sobrenadantes se filtraron, las proteínas se precipitaron con TCA y concentraron con MetOH-cloroformo. Finalmente, las muestras obtenidas se analizaron mediante *western blot*.

Posteriormente, se centrifugó a 3420 x g durante 30 min a 4 °C y el precipitado se lavó 3 veces con 5 mL de con acetona fría y se dejó secar a temperatura ambiente por una hora aproximadamente. La muestra obtenida se sometió a extracción con MetOH-cloroformo mediante la resuspensión del precipitado en 500 µL de una dilución de MetOH 20% en H₂O y se transfirió a un tubo Eppendorf, en donde se adicionó 10 µL de cloroformo y se agitó vigorosamente con vórtex. Se adicionaron 300 µL de H₂O desionizada y se mezcló por inversión. La mezcla se centrifugó a 9000 x g y se descartó la fase acuosa (fase superior). Se adicionaron 300 µL de MetOH y se centrifugó a 9000 x g durante 2 min. El sobrenadante se removió, el sedimento se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se resuspendió en 40 µL de tampón Laemmli 4x (Figura 6).

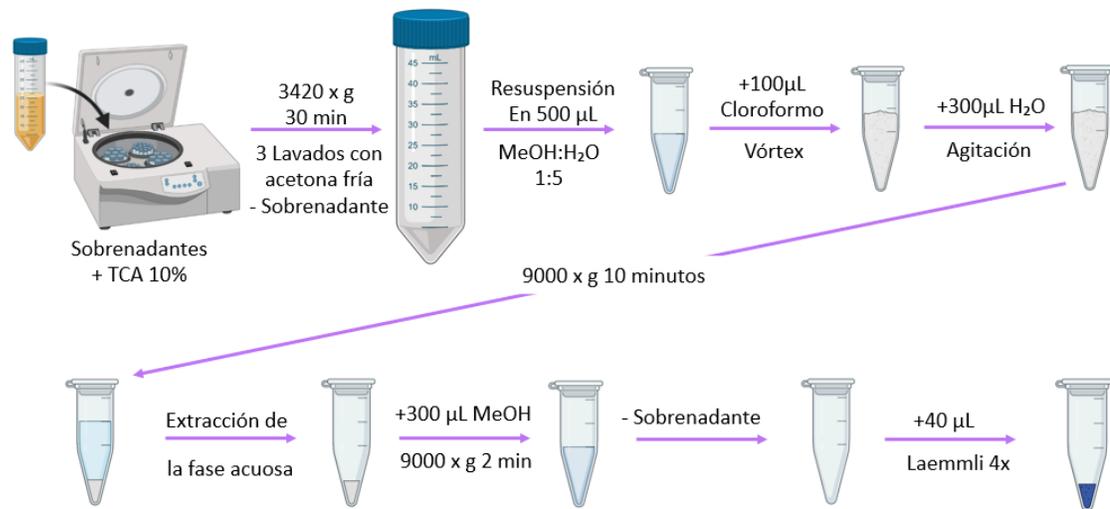


Figura 6.- Precipitación de proteínas mediante extracción MetOH-cloroformo. Las proteínas precipitadas con TCA 10% se sedimentaron por centrifugación y posteriormente se concentraron utilizando el esquema experimental de extracción MetOH-cloroformo señalado.

5.8.5.- Inmunodetección de la proteína de fusión SseJ-CyaA' en sobrenadantes de cultivos mediante *western blot*

El análisis de las proteínas totales presentes en los sobrenadantes de los cultivos bacterianos se realizó como se describe en la **Sección 5.8.3.**

5.9.- Generación de cepas mutantes $\Delta invA$ y $\Delta ssaD$ con fusiones génicas cromosomales al reportero CyaA'

Con la finalidad de caracterizar la translocación del efector SseJ al citoplasma de *D. discoideum* mediante los T3SS de *S. Typhimurium*, se generaron cepas portadoras del alelo que permite la expresión de la fusión del efector SseJ a CyaA' a partir de una fusión génica cromosomal. Este tipo de construcción permite la producción de la proteína de fusión bajo las condiciones ambientales necesarias para la expresión del gen silvestre. También se construyeron cepas que portan la fusión génica cromosomal y que adicionalmente presentan el gen *invA* o *ssaD* delecionado. Estos genes codifican componentes estructurales esenciales para la secreción de efectores del T3SS-1 y T3SS-2, respectivamente.

5.9.1.- Eliminación del *cassette* de resistencia a antibiótico para la generación de la cepa *sseJ_cyaA'*-FRT

La cepa derivada de *S. Typhimurium*, *sseJ_cyaA'*-Kan (Fernández et al., 2021), la cual expresa la proteína de fusión SseJ-CyaA', se aisló en agar LB complementado con Kan a 37°C. La mutante se transformó por electroporación (ver **Sección 5.7.5**) con el plasmidio termosensible pCP20 (**Tabla 2**) que codifica la recombinasa Flp, la cual escinde el *cassette* de resistencia a antibiótico flanqueado por los sitios FRT mediante

recombinación, dejando como remanente una única copia del sitio FRT en el cromosoma (Datsenko y Wanner, 2000, **Figura 7**). Las transformantes se seleccionaron sembrando en agar LB suplementado con Amp y se incubaron a 30°C durante 24 h. Posteriormente, se seleccionaron aproximadamente 30 colonias para incubación a 37°C (temperatura restrictiva para el plasmidio pCP20) en agar LB con y sin Kan, repitiendo el proceso hasta que sólo se presentara crecimiento en el medio sin antibiótico. La eliminación del gen de resistencia a antibiótico se comprobó mediante PCR de las colonias crecidas en agar LB sin antibiótico, analizando los fragmentos amplificados por electroforesis en geles de agarosa (ver **Sección 5.7.3**). Finalmente, las mutantes comprobadas por PCR se cultivaron sucesivamente en agar LB suplementado y no suplementado con Amp a 37°C, verificando la pérdida del plasmidio pCP20 al recuperar colonias sensibles al antibiótico

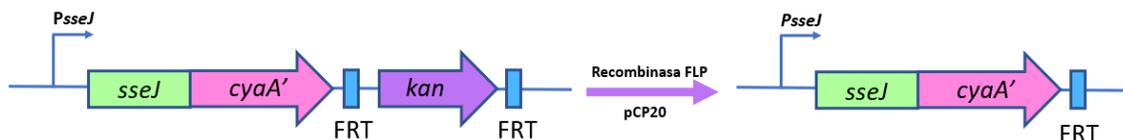


Figura 7.- Esquema de la eliminación del *cassette* de resistencia a Kan.

5.9.2.- Transducción de los alelos mutantes $\Delta invA$ y $\Delta ssaD$ al fondo genético *sseJ::cyaA'*

Con el fin de generar las cepas $\Delta invA/sseJ_cyaA'$ -FRT y $\Delta ssaD/sseJ_cyaA'$ -FRT se movilizaron los alelos mutantes $\Delta invA::Kan$ y $\Delta ssaD::Kan$ mediante transducción generalizada desde el cromosoma de las cepas dadoras correspondientes al fondo genético *sseJ::cyaA'*-FRT, usando el bacteriófago P22 HT 105-1 *int*-201 (Maloy, 1990).

5.9.2.1.- Preparación de los lisados de las partículas transductoras

Las cepas mutantes $\Delta invA::Kan$ y $\Delta ssaD::Kan$ se cultivaron en caldo LB a 37°C durante 24 h. Se mezclaron 200 μ L de cada cultivo bacteriano con 1 mL de caldo de fago P22 (100 mL de caldo LB suplementado con 100 μ L de un lisado concentrado de fago P22 HT 105-1 int-201 y medio mínimo E y se incubaron a 37°C con agitación durante 16 h para permitir la infección de las cepas dadoras. Para eliminar las bacterias remanentes, se agregó 100 μ L de cloroformo y se agitó vigorosamente en vórtex, seguido de una centrifugación a 18300 x g durante 1 min a temperatura ambiente. Al sobrenadante recuperado se le agregó 50 μ L de cloroformo y se almacenó como lisado a 4°C para su uso posterior.

5.9.2.2.- Transducción

La cepa de $sseJ::cyaA'-FRT$ se cultivó en caldo LB a 37°C con agitación durante 16 h. La transducción se realizó mezclando 200 μ L del cultivo de la cepa receptora $sseJ::cyaA'-FRT$ con 20 μ L del lisado de fago P22 obtenido a partir de las cepas donadoras $\Delta invA::Kan$ o $\Delta ssaD::Kan$. La mezcla se incubó a 37°C durante 30 min sin agitación para permitir la adsorción de las partículas transductantes y luego se centrifugó a 18.300 x g. El sedimento se resuspendió en 200 μ L de caldo LB fresco suplementado con Kan y se incubó a 37° con agitación durante 20 min. Las colonias transductantes se seleccionaron sembrando en agar LB suplementado con Kan e incubando a 37°C durante 16 h. En las mismas condiciones también se sembraron e incubaron los controles negativos de transducción, uno sin lisado de fago P22 (100 μ L

del cultivo de la cepa receptora) y otro sin bacterias receptoras (10 μ L del lisado P22 más 90 μ L de caldo LB).

5.9.2.3.- Comprobación y selección de las transductantes

La correcta movilización del alelo mutante por transducción se comprobó mediante PCR de colonias (ver **Sección 5.7.2**) escogidas aleatoriamente entre los clones obtenidos utilizando los partidores *sseJ_out3* y *sseJ_out5*. Con el propósito de remover la posible contaminación con partículas remanentes del fago P22, las transductantes comprobadas por PCR se aislaron repetidamente en agar EBU (agar LB suplementado con K_2HPO_4 2,5 g/L, azul de Evans 12,5 mg/L, uranina 25 mg/L y glucosa 2 g/L) suplementado con Kan hasta obtener colonias sin evidencia de lisis a causa de la infección por el fago P22 (colonias blancas). La ausencia del fago P22 en las transductantes aisladas se verificó evaluando su sensibilidad al bacteriófago lítico P22 H5 mediante un ensayo de *cross streaking*. En este ensayo, las colonias a analizar se sembraron cruzando en forma perpendicular una línea trazada con 50 μ L de lisado del fago P22 H5 sobre la superficie de una placa de agar EBU suplementado con Kan, la cual fue incubada a 37°C durante 16 h. Finalmente, se seleccionaron y respaldaron aquellas transductantes libres de fago P22, las que fueron identificadas al resultar interrumpido su crecimiento en presencia del fago P22 H5.

5.10.- Comprobación de la producción de la proteína de fusión SseJ-CyaA' en las cepas *sseJ_cyaA'*-FRT, $\Delta invA/sseJ_cyaA'$ -FRT y $\Delta ssaD/sseJ_cyaA'$ -FRT

Con la finalidad de evaluar la expresión de la proteína de fusión, se realizaron cultivos de la cepa silvestre de *S. Typhimurium* 14028s y de las cepas que expresan la proteína de fusión SseJ-CyaA', *sseJ_cyaA'*-FRT, $\Delta invA/sseJ_cyaA'$ -FRT y

$\Delta ssaD/sseJ_cyaA'$ -FRT, y se detectó la fusión SseJ-CyaA' en los sedimentos bacterianos de los cultivos.

5.10.1.- Preparación de muestras de lisados de bacterias para *western blot*

Las cepas fueron cultivadas en caldo LB a 37°C con agitación durante 16 h. Posteriormente se cultivaron bajo condiciones inductoras de la expresión de la SPI-1 y SPI-2. Para la inducción de la SPI-1, se realizó una dilución 1:100 en 20 mL de caldo LB suplementado con NaCl (0,3 M) y se cultivó a 37°C durante 5 h sin agitación. Para las condiciones inductoras de la SPI-2, los cultivos se lavaron 3 veces con medio mínimo N (KCl 5 mM, (NH₄)SO₄ 0,5 mM, K₂SO₄ 0,5 mM, KH₂PO₄ 1 mM, MgCl₂ 10 µM, MES 100 mM pH=5,8), se realizó una dilución 1:50 en 20 mL de medio mínimo N suplementado con casaminoácidos (0,1%) y glucosa (0,4%) como fuente de carbono, y se incubó a 37°C con agitación durante 5 h. Luego se separó la fracción bacteriana del medio de cultivo y se trataron las muestras de la misma forma en la que se trataron a los lisados de las fusiones plasmidiales (ver Sección 5.8.1, Figura 8).

5.10.2.- Detección de la proteína de fusión SseJ-CyaA' en lisados bacterianos

Ver Sección 5.8.3.

5.11.- Determinación de la translocación del efector SseJ de *S. Typhimurium* al citoplasma de *D. discoideum*

Con la finalidad de evaluar la translocación de la proteína efectora SseJ al citoplasma de *D. discoideum*, se realizaron co-incubaciones de la ameba con la cepa silvestre de *S. Typhimurium* 14028s y con las cepas *sseJ_cyaA'*-FRT, $\Delta invA/sseJ_cyaA'$ -FRT y $\Delta ssaD/sseJ_cyaA'$ -FRT, las cuales expresan la proteína de fusión SseJ-CyaA' desde

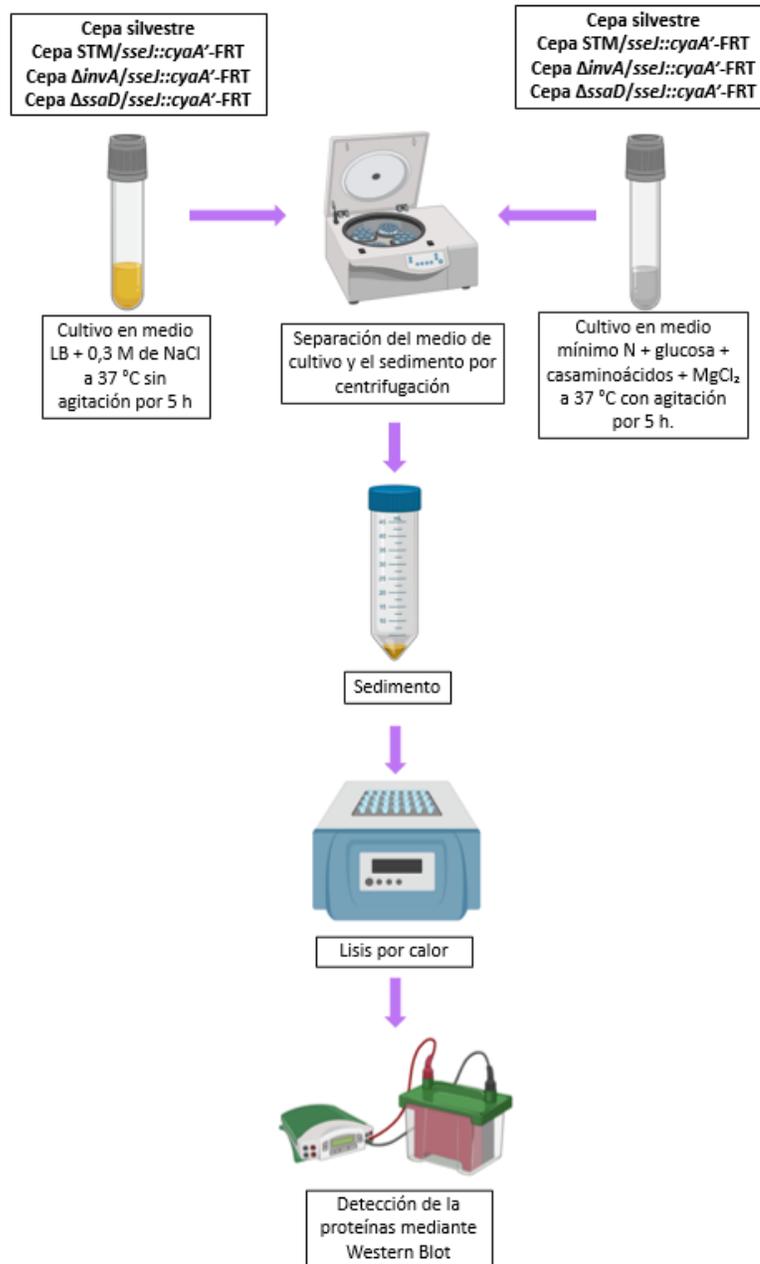


Figura 8.- Ensayo de expresión del efector SseJ de *Salmonella* en condiciones inductoras de las islas de patogenicidad. Las cepas portadoras del alelo mutante *sseJ-cyaA'*-FRT, con fondo genético silvestre y con mutaciones en los genes $\Delta invA$ y $\Delta ssaD$, se cultivaron en condiciones que inducen la expresión de los genes de la SPI-1 y SPI-2. Las proteínas de los lisados bacterianos se sometieron a SDS-PAGE en geles de poliacrilamida 12% y se transfirieron a una membrana de PVDF. La detección de la fusión SseJ-CyaA' se detectó mediante *western blot* usando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CyaA' y se utilizó un anticuerpo secundario conjugado a HRP y se reveló con el sustrato *SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate*.

las fusiones génicas cromosomales. Luego se separó la fracción citosólica asociada a los sobrenadantes y la fracción del sedimento asociado a bacterias y se determinó la presencia de la proteína de fusión mediante inmunodetección.

5.11.1.- Ensayo de translocación del efector SseJ de *S. Typhimurium* al citoplasma de *D. discoideum* AX4

Las amebas se cultivaron en botellas de cultivo T50 hasta alcanzar una confluencia de 95-100% y el día anterior al ensayo se sembró 1×10^7 amebas en botellas T25, en medio de cultivo HL5 suplementado con Amp. Paralelamente, las cepas bacterianas se cultivaron en caldo LB durante 16 h a 37 °C con agitación. Al día siguiente las bacterias se lavaron 3 veces con solución amortiguadora Sörensen 1x (Na_2HPO_4 0,1333 M, KH_2PO_4 0,133 M, pH 6,0), y se resuspendieron en la misma solución amortiguadora.

Previo a la infección, las amebas se lavaron 3 veces con 5 mL de solución amortiguadora Sörensen y luego se co-incubaron a 23 °C sin agitación con las cepas a evaluar, con una multiplicidad de infección (MOI) de 100 bacterias/ameba. Transcurridas 3 y 6 h, los volúmenes de co-incubación se recuperaron y se sedimentaron para recuperar las amebas. Luego, las amebas se lisaron resuspendiéndolas en solución amortiguadora Sörensen suplementada con Triton X-100 (0,2%). Para la recuperación de la fracción citoplasmática libre de bacterias, los lisados de amebas se centrifugaron a 3420 x g a 4 °C durante 10 min y el sobrenadante fue filtrado con un filtro de 0,22 μm . Las proteínas del filtrado se trataron de la forma mencionada en la **Sección 5.8.4** Por su parte, los sedimentos asociados a bacterias se resuspendieron en PBS 1x, se midió la $\text{OD}_{600\text{nm}}$ de cada sedimento y se concentraron para obtener una biomasa equivalente a

una unidad de OD_{600nm} en 1 mL. De la suspensión obtenida se sacaron 75 µL de PBS 1x y se mezclaron con 25 µL de tampón Laemmli 4x suplementado con β-mercaptoetanol (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,01%, β-mercaptoetanol). Finalmente, los lisados fueron hervidos durante 10 min a 100°C y se almacenaron a -20°C hasta su uso (**Figura 9**).

5.12.- Construcción de la mutante Δ sseJ de *Salmonella* Typhimurium 14028s

La cepa mutante Δ sseJ derivada de *S. Typhimurium* 14028s se construyó mediante la deleción del gen mencionado utilizando el método de intercambio alélico por recombinación de productos de PCR dependiente de la recombinasa Red del fago λ (Datsenko y Wanner, 2000) con modificaciones (Santiviago et al., 2009), como se esquematiza en la **Figura 10**.

5.12.1.- Amplificación por PCR del *cassette* de resistencia antibiótica

Para la generación de los productos de PCR necesarios para la deleción del gen sseJ, se utilizaron los partidores sseJ_H1+P1 y sseJ_H2+P2 (ver **Tabla 3**), los cuales en su extremo 5' contienen 40 nucleótidos idénticos a las regiones que flanquean al gen sseJ. Además, los partidores presentan en su extremo 3' una secuencia de 20 nucleótidos que hibridan con el extremo 5' o 3' del *cassette* de resistencia a antibiótico del plasmidio pCLF4. Dentro del *cassette* y flanqueado por los sitios FRT está contenido el gen *aph*, el cual codifica la enzima aminoglicósido 3' fosfotransferasa, la cual confiere resistencia a Kan. A partir del plasmidio pCLF4 el *cassette* de resistencia a Kan se amplificó mediante PCR en las condiciones indicadas a continuación:

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración final	Programa de PCR		
H ₂ O libre de nucleasas	39,7	-	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Buffer Taq (10x)	5	1x	95 °C	2 min	
MgCl ₂ (50 mM)	1,5	1,5 mM	95 °C	30 seg	30
sseJ_H1+P1 (10 μM)	1	0,2 μM	55 °C	30 seg	
sseJ_H2+P2 (10 μM)	1	0,2 μM	72 °C	90 seg	
dNTPs (10 mM)	1	0,2 mM	72 °C	5 min	
pCLF4	0,5	-	20 °C	∞	
Taq Polimerasa (5 U/ μL)	0,3				
Volumen final	50 μL				

El fragmento amplificado se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TAE 1x y tinción con *GelRed*. La corrida electroforética se efectuó a 100 V durante 30 min. Una vez que se verificó su tamaño (~1500 pb), el amplicón se purificó mediante el sistema comercial “*QIAquick PCR Purification Kit*”, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5.12.2.- Obtención de *S. Typhimurium* electrocompetentes y transformación con el plasmidio pKD46

Para la transformación del plasmidio pKD46 por electroporación se utilizó el mismo procedimiento que en la **Sección 5.7.5**, con la salvedad de que los lavados previos a la electroporación se realizaron con 15 mL de glicerol 15% frío y se transformó con 3 μL de plasmidio.

pKD46 es un plasmidio termosensible que contiene las secuencias necesarias para la expresión de la recombinasa Red del fago λ . La expresión del gen que codifica la enzima está bajo el control del promotor *P_{araBAD}*, el cual es inducible por arabinosa (Datsenko y Wanner, 2000).

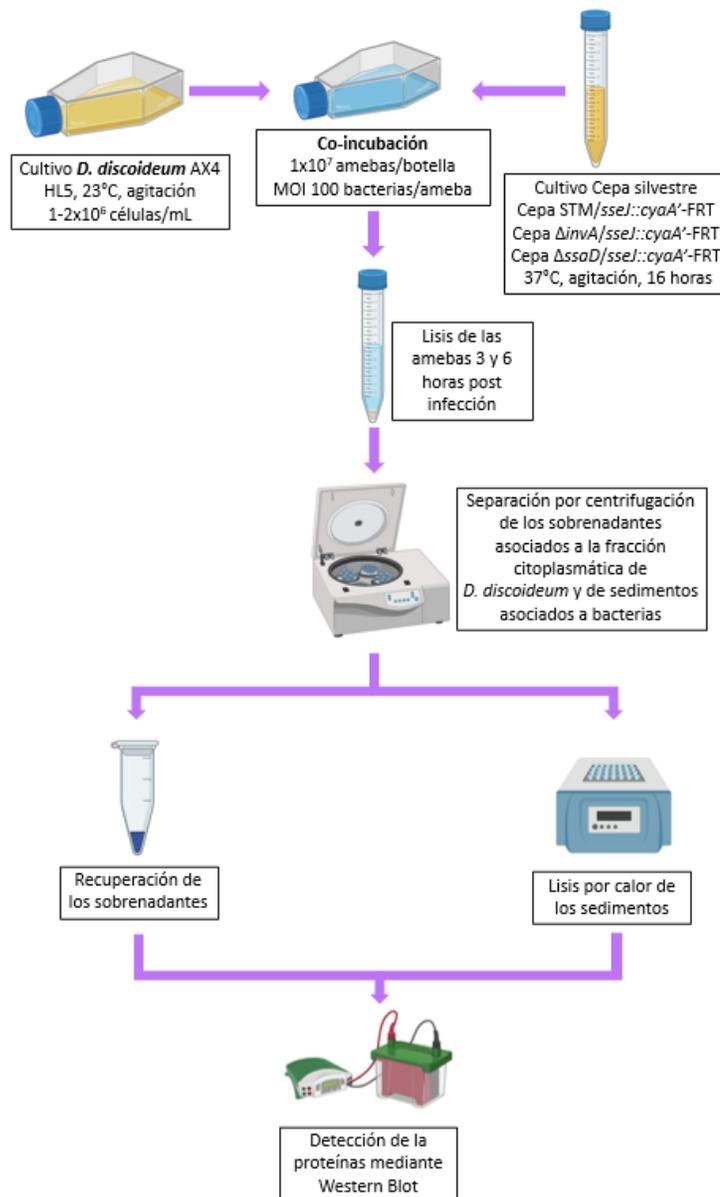


Figura 9.- Ensayo de translocación del efector *SseJ* de *Salmonella* al citoplasma de *D. discoideum*. Se realizaron infecciones de la ameba con las cepas portadoras del alelo mutante *sseJ::cyaA'-FRT*, con fondo genético silvestre y con mutaciones en los genes Δ invA y Δ ssaD. A las 3 y 6 h post infección se obtuvieron muestras correspondientes al citoplasma de las amebas infectadas y de las bacterias intracelulares recuperadas desde ellas. Las proteínas de ambas fracciones se sometieron a SDS-PAGE en geles de poliacrilamida 12% y se transfirieron a una membrana de PVDF. La detección de la fusión SseJ-CyaA' se detectó mediante *western blot* usando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CyaA' y se utilizó un anticuerpo secundario conjugado a HRP y se reveló con el sustrato *SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate*.

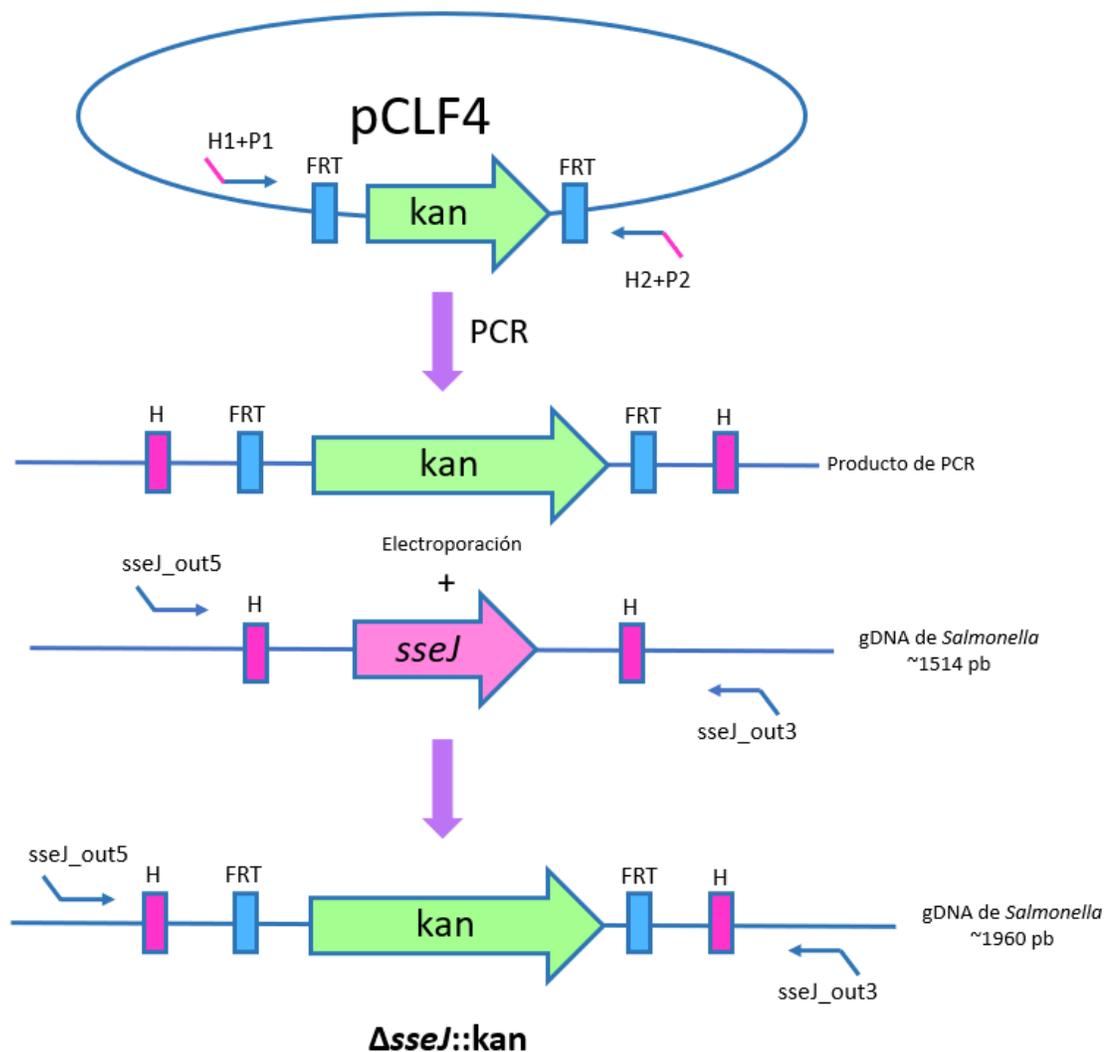


Figura 10. Generación de cepas mutantes de *S. Typhimurium* mediante el método de “Red-swap”. Esquema general del método (Datsenko y Wanner, 2000). Los detalles se describen en el texto.

5.12.3.- Mutagénesis mediante intercambio alélico con productos de PCR

Las colonias de *S. Typhimurium* transformadas con el pKD46 se cultivaron en medio LB suplementado con Amp a 30°C con agitación durante 16 h. Se realizó un subcultivo bacteriano de dilución 1:100 en caldo LB suplementado con Amp con un

volumen final de 20 mL, el cual fue incubado a 30°C con agitación hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0,4-0,6, momento en el cual se adicionó L-arabinosa a una concentración final de 10 mM para inducir la expresión del sistema de recombinación λ-Red. Luego de incubar durante 60 min a 30°C con agitación, se prepararon las bacterias electrocompetentes (ver Sección 5.12.2).

Se mezcló 80 µL de la suspensión de bacterias electrocompetentes con 10 µL de producto de PCR previamente purificado. Se procedió a la transformación mediante electroporación aplicando un pulso de 1,8 KV y se recuperó a las bacterias inmediatamente en 1 mL de LB durante 60 min, con agitación y a 37°C, temperatura de restricción para el plasmidio pKD46. Las mutantes se seleccionaron sembrando en agar LB suplementado con Kan e incubado a 37°C 16 h.

5.12.4.- Confirmación de las mutantes obtenidas mediante PCR

La verificación del reemplazo alélico en la mutante se realizó mediante PCR de colonias utilizando partidores que hibridan en regiones externas, río arriba y río abajo, respecto al sitio de reemplazo. Como DNA templado se utilizó la suspensión de una colonia mutante en 100 µL de H₂O libre de nucleasas estéril. El esquema de amplificación utilizado fue el siguiente:

Reactivo	Volumen (µL)	Concentración final
H ₂ O libre de nucleasas	11	-
Buffer Taq (5x)	4	1x
MgCl ₂ (25 mM)	1,6	2 mM
sseJ_out5 (10 µM)	0,4	0,2 µM
sseJ_out3 (10 µM)	0,4	0,2 µM
dNTPs	0,4	0,2 mM
gDNA (templado)	2	-
GoTaq DNA Polimerasa (5 U/µL)	0,2	
Volumen final	20 µL	

Programa de PCR		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	5 min	
95°C	30 seg	30
50°C	30 seg	
72°C	1 min	
72°C	2 min	
20°C	∞	

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en solución amortiguadora TAE 1x y tinción *GelRed*. La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 30 min.

5.13.- Transducción de alelo mutante Δ sseJ en *S. Typhimurium* 14028s

La transducción se realizó de la misma forma que en la **Sección 5.9.2**, con la salvedad de que la cepa donadora fue la mutante Δ sseJ.

5.14.- Ensayos de supervivencia por competencia *in vitro* entre cepas de *S. Typhimurium* en *D. discoideum* AX4

Con la finalidad de determinar la contribución del efector SseJ en la internalización y supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*, se realizaron infecciones de la ameba con mezclas en proporción 1:1 de la cepa silvestre con la cepa mutante Δ sseJ, o con la mutante Δ aroA, la cual presenta una supervivencia intracelular disminuida en *D. discoideum* (Cooper et al., 2016).

5.14.1.- Ensayo de competencia para evaluar internalización y supervivencia de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*.

Las amebas se cultivaron hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial ($1-2 \times 10^6$ células/mL) y la noche anterior al ensayo se sembró un millón de células por pocillo, en una placa de 6 pocillos, en medio de cultivo HL5. Por su parte, las cepas bacterianas se cultivaron toda la noche a 37°C con agitación y al día siguiente se lavaron 3 veces con solución amortiguadora Sørensen 1x (Na_2HPO_4 0,1333 M, KH_2PO_4 0,133 M, pH 6,0), y se diluyeron 5 veces, resuspendiéndolas en la misma solución amortiguadora. Finalmente, se realizaron mezclas 1:1 de la cepa mutante

correspondiente con la cepa silvestre para obtener la suspensión bacteriana para infectar las amebas. Previo a la infección, las amebas se lavaron 3 veces con solución amortiguadora Sörensen y luego se co-incubaron con la mezcla 1:1 de la cepa silvestre y la mutante a evaluar, de manera de tener una MOI de 100 bacterias/ameba.

Con la finalidad de conocer la MOI real del ensayo, se determinó la concentración de bacterias de cada suspensión mediante la dilución seriada en solución amortiguadora Sörensen 1x y recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en agar LB y agar LB suplementado con Kan incubado a 37° C durante 16 hrs.

Luego de 1 hora de co-incubación, las amebas se lavaron 3 veces con solución amortiguadora Sörensen con el fin de eliminar las bacterias extracelulares que pudieran estar presentes. Posteriormente, se añadieron 2 mL de solución amortiguadora Sörensen a cada pocillo y se incubó a 23° C sin agitación hasta los distintos tiempos de infección a ensayar (0, 1, 3, y 6 h). Para el recuento de bacterias en cada tiempo ensayado, se despegaron las amebas del pocillo con 500 µL de solución amortiguadora Sörensen se centrifugaron, a 200 x g durante 5 min a temperatura ambiente y se resuspendieron en 200 µL de solución amortiguadora Sörensen 1x suplementada con Gm (20 µg/mL). Luego, se descartaron 180 µL del sobrenadante y el sedimento se homogeneizó con 180 µL de solución tampón Sörensen 1x. Las amebas fueron nuevamente centrifugadas a 200 x g durante 5 min a temperatura ambiente y se eliminaron 80 µL de sobrenadante y los 20 µL restantes se lisaron añadiendo 80 µL de la misma solución amortiguadora suplementada con Triton X-100 al 0,2% para liberar las bacterias intracelulares. Se realizó una dilución seriada de los lisados obtenidos en cada tiempo en PBS 1x y se sembraron alícuotas de estas diluciones en placas de agar

LB para el recuento de bacterias totales y placas de agar LB suplementadas con Kan para las cepas mutantes. Las placas se incubaron a 37°C durante 16 h como mínimo y al día siguiente se realizó el recuento de las colonias obtenidas en cada dilución sembrada. En paralelo, se determinó el número de amebas viables en cada tiempo mediante el recuento de las células teñidas con azul de tripán en cámara de Neubauer (Figura 11).

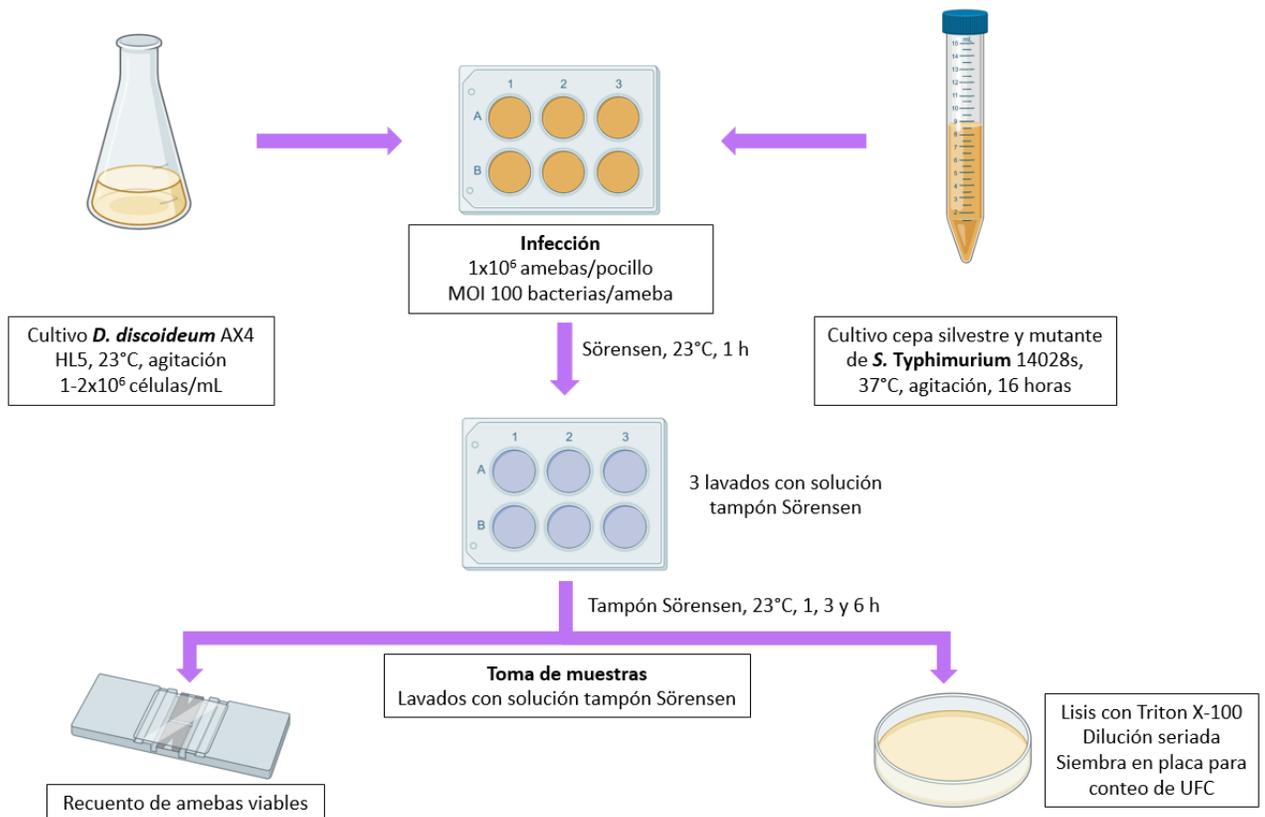


Figura 11. Ensayo de internalización y supervivencia de *S. Typhimurium* durante la infección de *D. discoideum*. Procedimiento experimental para evaluar la internalización y supervivencia de la cepa mutante de *S. Typhimurium* Δ seJ en *D. discoideum* mediante ensayos de competencia. Los detalles se mencionan en el texto.

5.14.2.- Expresión de los resultados obtenidos y análisis estadístico

Las UFC de cada mutante se expresaron como valores relativos a las UFC de la cepa silvestre en cada tiempo de infección (0, 1, 3 y 6 h post infección). Con los datos obtenidos se calculó el índice de competencia (CI) para la internalización y supervivencia de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$CI = \frac{\left[\frac{UFC_{mutante}}{UFC_{silvestre}} \right]_{Final}}{\left[\frac{UFC_{mutante}}{UFC_{silvestre}} \right]_{Inicial}}$$

El CI para la internalización se calculó considerando como razón de UFC inicial a las bacterias cuantificadas en el inóculo y como razón de UFC final a las bacterias intracelulares recuperadas en el tiempo 0. Para el CI de la supervivencia intracelular se consideró como razón de la UFC inicial a las bacterias recuperadas a tiempo 0 y como razón final a las bacterias intracelulares recuperadas a los tiempos 1, 3, y 6 h post infección.

Los valores de CI calculados fueron expresados como logaritmo en base 10 (Log_{10}) y se interpretaron de acuerdo con los siguientes criterios:

$\text{Log}_{10}(\text{CI}) < 0$ Indica que la cepa mutante sobrevive o invade menos que la cepa silvestre

$\text{Log}_{10}(\text{CI}) = 0$ Indica que la cepa mutante se comporta como la cepa silvestre

$\text{Log}_{10}(\text{CI}) > 0$ Indica que la cepa mutante sobrevive o invade más que la cepa silvestre.

La significancia estadística se determinó a partir de 3 réplicas biológicas utilizando la prueba estadística *t* de Student de dos colas.

6.- RESULTADOS

El uso de fusiones traduccionales ha resultado tremendamente útil para evaluar la translocación de efectores de los sistemas de secreción bacterianos al citoplasma de células eucariontes. Una de estas estrategias ha sido la fusión de los distintos efectores al dominio catalítico de la toxina CyaA de *Bordetella pertussis* (Sory et al., 1994) El uso de este dominio se debe a que presenta actividad adenilato ciclasa dependiente de calmodulina, proteína que sólo se encuentra en el citoplasma de células eucariontes y no en el citoplasma bacteriano. Esta característica permite monitorear el proceso de translocación de las proteínas efectoras desde bacterias como *Salmonella* a una célula hospedera eucarionte durante la infección, mediante la medición de los niveles de AMPc. Por otra parte, se encuentran disponibles anticuerpos contra el dominio CyaA', por lo que también es posible determinar la translocación de los efectores mediante la inmunodetección de la proteína de fusión en la fracción citoplasmática de la célula hospedera.

En este trabajo se construyeron distintas cepas derivadas de *S. Typhimurium* que portan la fusión *sseJ-cyaA'*, la cual permite la producción de la proteína de fusión SseJ-CyaA'. Esta fusión ha permitido caracterizar la translocación del efector SseJ al citoplasma de distintas células hospederas, habiéndose evaluado en macrófagos RAW264.7 (Miao y Miller, 2000) y J774 (Niemann et al., 2011). Lo anteriormente expuesto tiene como finalidad evaluar la translocación del efector SseJ del T3SS-2 al citoplasma de *D. discoideum*, modelo para investigar la importancia de los T3SS de *Salmonella* en la interacción patógeno-hospedero.

6.1.- Construcción de la fusión plasmidial pMMB207::*sseJ-cyaA'*

Se generaron las cepas pMMB207::*sseJ-cyaA'*, $\Delta invA$ /pMMB207::*sseJ-cyaA'* y $\Delta ssaD$ /pMMB207::*sseJ-cyaA'*, todas derivadas de *Salmonella* Typhimurium 14028s (ver Sección 5.7). Estas cepas expresan la proteína de fusión SseJ-CyaA' a partir del plasmidio pMMB207::*sseJ-cyaA'*. Esta proteína presenta una fusión C-Terminal al dominio CyaA' de *B. pertussis*, el cual permite detectar la producción de SseJ en *S. Typhimurium* mediante la inmunodetección de este dominio mediante *western blot*.

Para realizar la construcción génica que permite expresar la proteína de fusión SseJ-CyaA' desde un plasmidio, se extrajo el gDNA de *S. Typhimurium* 14028s (Figura 12A) y posteriormente se amplificó el gen *sseJ* desde el gDNA con los partidores *sseJ_CyaA_5'* y *sseJ_CyaA_3'*, que contenían sitios de restricción para las enzimas *XbaI* (5') y *XhoI* (3'). El producto de PCR obtenido presentó el tamaño esperado de 1261 pb (Figura 12B). Este producto fue purificado y ligado al vector comercial pGEM-T Easy, para generar el plasmidio pGEM-T::*sseJ*. Los productos de ligación fueron dializados y transformados mediante electroporación en *E. coli* DH5 α electrocompetentes. Se confirmó la existencia de colonias portadoras del pGEM-T::*sseJ* mediante PCR de colonias utilizando los partidores *sseJ_CyaA_5'* y *sseJ_CyaA_3'*, obteniéndose el amplicón de tamaño esperado de 1437 pb (Figura 12C).

El plasmidio pGEM-T::*sseJ* fue extraído desde la colonia transformante #10 de *E. coli* DH5 α . Paralelamente, se realizó la extracción del plasmidio pMMB207::*pphB-cyaA'* desde la cepa derivada de *E. coli* TOP10 que lo contenía (Figura 13A).

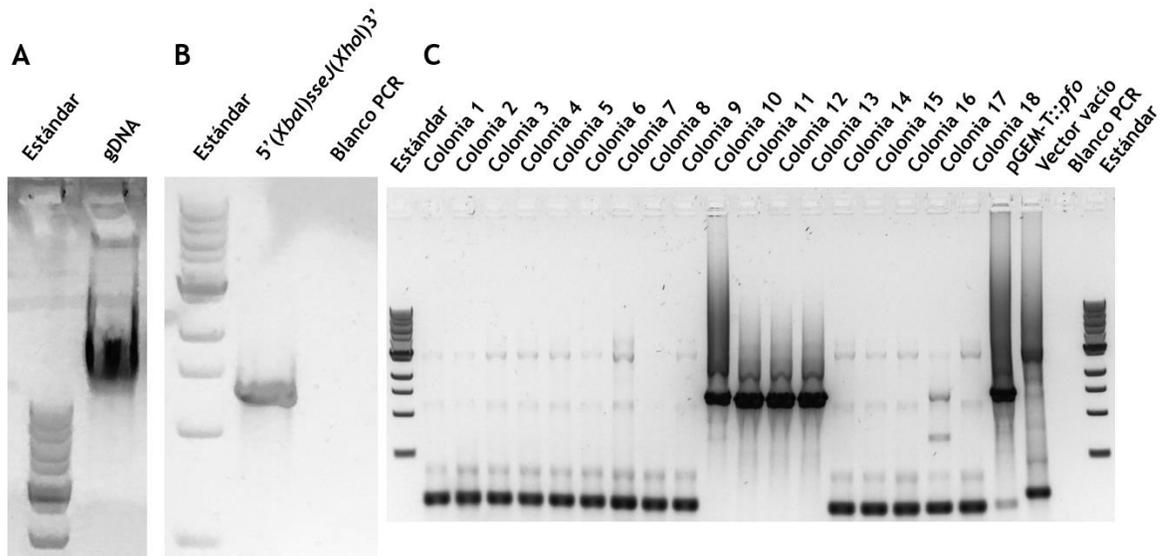


Figura 12. Construcción del plasmidio pGEM-T::sseJ-cyaA'. (A) Productos de la extracción de gDNA de *S. Typhimurium* 14028s con el sistema comercial “GenElute Bacterial Genomic DNA Kit”. (B) Producto de PCR de la amplificación del gen *sseJ* desde el gDNA, utilizando los partidores *sseJ_CyaA_5'* y *sseJ_CyaA_3'*. La banda obtenida corresponde al tamaño esperado de 1261 pb. (C) Productos de PCR de colonias obtenidas de *E. coli* DH5α transformadas con el plasmidio pGEM-T::sseJ, utilizando los partidores SP6 y T7. Las bandas observadas en las colonias transformantes corresponden al tamaño esperado de 1437 pb. Imágenes obtenidas a partir de electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Luego de la extracción, los plasmidios fueron digeridos con las enzimas *XbaI* y *XhoI* (Figura 13A y 13B) y los productos deseados fueron purificados desde un gel preparativo de agarosa. Posteriormente, se realizó la ligación del inserto obtenido desde el pGEM-T::sseJ con el esqueleto obtenido desde el pMMB207::p*phB-cyaA'*. Los productos de ligación se transformaron por electroporación en *E. coli* DH5α electrocompetentes, obteniéndose colonias transformantes con el plasmidio pMMB207::sseJ-cyaA'. La inserción del gen *sseJ* en este plasmidio se confirmó mediante PCR de colonias utilizando los partidores pMMB207_Fw y pMMB207_Rv, obteniéndose el producto de PCR correspondiente al tamaño esperado de aproximadamente 2460 pb (Figura 14D).

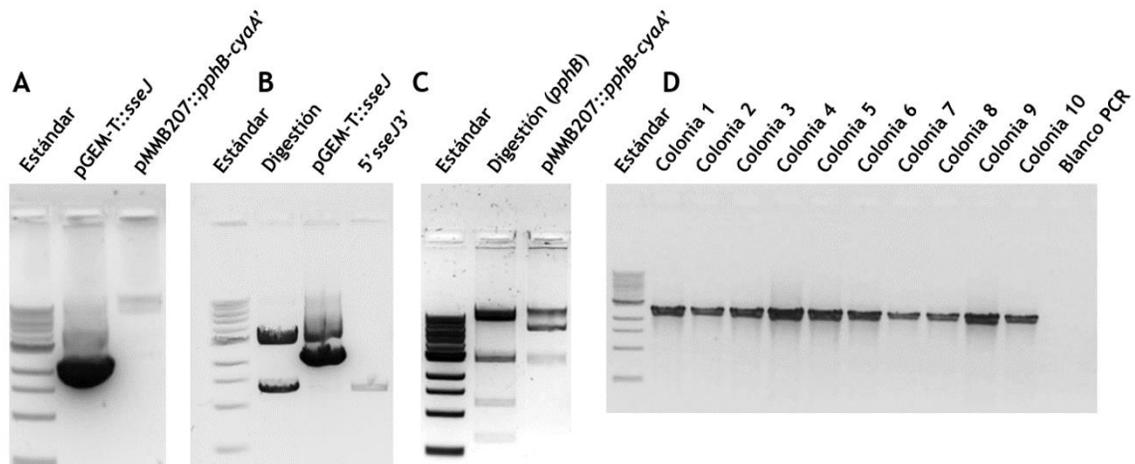


Figura 13. Construcción del plasmidio pMMB207::sseJ-cyaA'. (A) Productos de la extracción de los plasmidios señalados usando el sistema comercial “Qiagen Plasmid Maxi Kit”. Gel de agarosa al 1%. (B) Productos de la digestión de pGEM-T::sseJ con las enzimas *XhoI* y *XbaI*. Gel de agarosa al 1% (C) Productos de la digestión de pMMB207::pphB-cyaA' con las enzimas *XhoI* y *XbaI*. Gel de agarosa al 0,8%. (D) Productos de PCR de las colonias obtenidas de la transformación con el producto de ligación del inserto derivado de pGEM-T::sseJ y el esqueleto derivado de pMMB207::pphB-cyaA' (colonias 1 a 10). Se utilizaron los partidores pMMB207_Fw y pMMB207_Rv, obteniéndose bandas de tamaño esperado (aproximadamente 2460 pb).

Una vez obtenidas las colonias de *E. coli* DH5 α /pMMB207::sseJ-cyaA' se realizó la extracción del plasmidio, el cual se transformó en *S. Typhimurium* 14028s para analizar la expresión de la proteína de fusión a partir del plasmidio construido.

6.2.- Producción de la proteína SseJ en *S. Typhimurium* 14028s

Una vez realizada la construcción de las fusiones plasmidiales de *sseJ* a *cyaA'*, fue necesario evaluar la expresión del producto de esta fusión, la proteína SseJ-CyaA'. Esto se realizó en presencia de IPTG, condición inductora de la actividad transcripcional del plasmidio pMMB207::sseJ-cyaA'.

Para confirmar la presencia de proteínas en los lisados bacterianos de la cepa silvestre y la cepa silvestre transformada con el plasmidio, se realizó la separación por

masa molecular de las proteínas obtenidas de dichos lisados mediante SDS-PAGE y los geles se tiñeron con azul de Coomassie (ver **Sección 5.8.2**). Se observa la presencia de proteínas en las muestras obtenidas tanto de la cepa silvestre de *S. Typhimurium* como de la cepa portadora del plasmidio cultivadas en presencia y ausencia de IPTG (**Figura 14A**).

La detección de la proteína de fusión se llevó a cabo mediante ensayos de *western blot* (ver **Sección 5.8.3**) con muestras de lisados bacterianos obtenidos de las cepas silvestre y 14028s/pMMB207::*sseJ-cyaA'*, ambas crecidas a 37°C en medio de cultivo LB suplementado o no con IPTG.

Se inmunodetectó la proteína de fusión en la cepa portadora del pMMB207::*sseJ-cyaA'* bajo condiciones de cultivo en presencia de IPTG, y se observó una banda que presentó una masa molecular esperada de ~89 kDa. Esta banda no estaba presente en el sedimento del cultivo que no fue suplementado con IPTG. En el caso de la cepa silvestre, no se detectó la proteína SseJ-CyaA' ni en los sedimentos del cultivo realizado en condiciones inductoras de la expresión de la fusión ni en el sedimento del cultivo carente de IPTG. Por otra parte, no se obtuvo bandas de detección inespecífica en las muestras obtenidas a partir de la cepa silvestre de *S. Typhimurium* usadas como control, ni en la muestra obtenida desde la cepa portadora del plasmidio cultivada en ausencia de IPTG (**Figura 14B**).

El resultado obtenido demuestra la producción de la proteína de fusión SseJ-CyaA' desde la construcción plasmidial generada, en presencia de IPTG.

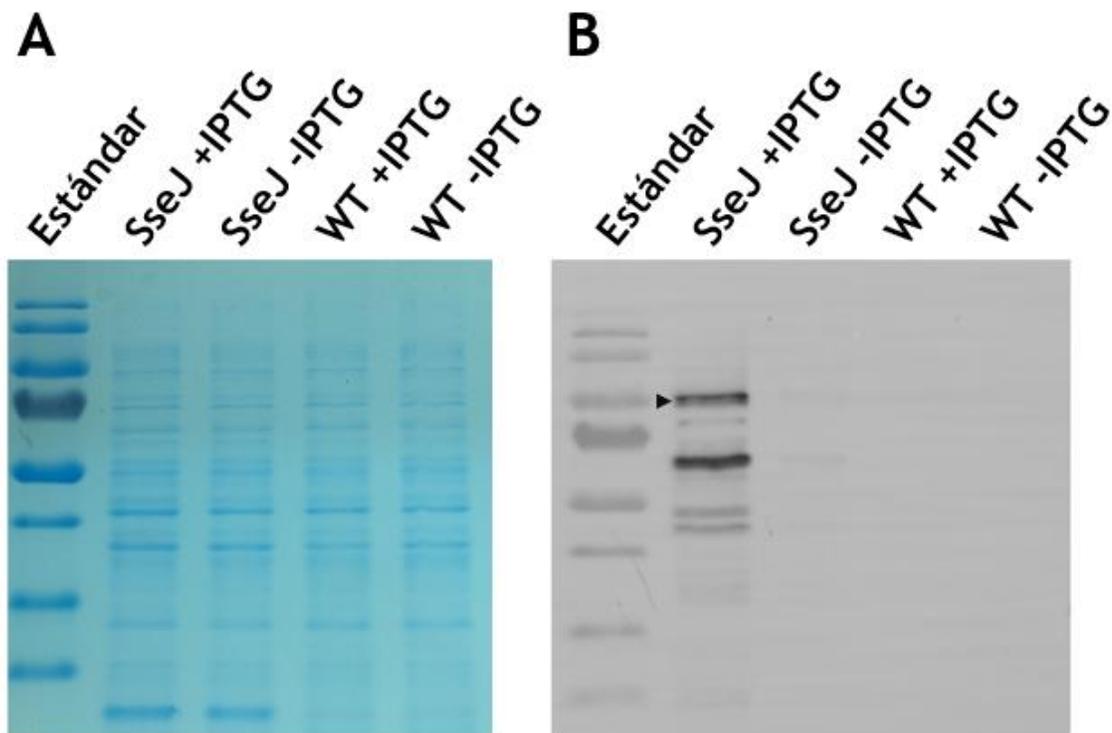


Figura 14. La proteína de fusión SseJ-CyaA' es producida a partir de una fusión plasmidial. **(A)** SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% de muestras de lisados bacterianos obtenidos de cultivos bacterianos incubados a 37°C en medio de cultivo suplementado con IPTG o sin suplementar. Gel teñido con azul de Coomassie. **(B)** Inmunodetección mediante *western blot* de la fusión SseJ-CyaA' utilizando un anticuerpo primario anti-CyaA'. En la imagen capturada mediante el sistema *Dyversity 4* se indica con una cabeza de flecha la banda de peso molecular esperado de ~89 kDa correspondiente a la proteína de fusión SseJ-CyaA'.

6.3.- Secreción *in vitro* del efector SseJ al medio de cultivo

Una vez generada la cepa 14028s/pMMB207::*sseJ-cyaA'* y confirmada la expresión de la proteína de fusión SseJ-CyaA', se generaron las cepas derivadas $\Delta invA$ /pMMB207::*sseJ-cyaA'* y $\Delta ssaD$ /pMMB207::*sseJ-cyaA'* mediante la transformación de las cepas mutantes $\Delta invA$::Kan y $\Delta ssaD$::Kan con el pMMB207::*sseJ-cyaA'*. Los genes *invA* y *ssaD* codifican componentes estructurales esenciales para la translocación de los efectores del T3SS-1 y T3SS-2, respectivamente, por lo que la ausencia de estos genes

impediría la secreción de sus proteínas efectoras. Por lo tanto, estas cepas mutantes permitieron evaluar la secreción de SseJ a través de los T3SS de *S. Typhimurium* y su translocación hacia la célula hospedera en los ensayos de infección de *D. discoideum*.

Para la caracterización de la secreción *in vitro* del efector SseJ se realizaron cultivos de las cepas 14028s/pMMB207::*sseJ-cyaA'*, $\Delta invA$ /pMMB207::*sseJ-cyaA'* y $\Delta ssaD$ /pMMB207::*sseJ-cyaA'* en medio de cultivo suplementado con IPTG o sin suplementar. El medio de cultivo se separó del sedimento bacteriano por centrifugación y se determinó la secreción del efector a través de los T3SS mediante la detección por *western blot* del epítipo CyaA' y de la proteína chaperona citoplasmática DnaK. El uso de un anticuerpo contra DnaK permite determinar la presencia de contenido citoplasmático bacteriano en las muestras, por lo que se puede discriminar si la presencia de SseJ-CyaA' se debe a su secreción o a la lisis bacteriana. El anticuerpo primario utilizado para la detección de DnaK permite detectar esta proteína, que presenta una masa molecular de 70 KDa. Previo a la detección, el sobrenadante del cultivo fue filtrado para eliminar las bacterias remanentes y las proteínas totales presentes en la muestra fueron concentradas (ver **Sección 5.8.4**).

Como se observa en la **Figura 15**, se detectó la proteína de fusión SseJ-CyaA' tanto en los lisados totales como en los sobrenadantes provenientes del cultivo en presencia de IPTG de la cepa portadora del plasmidio. En cambio, no se observó reacción positiva bajo ninguna condición de cultivo en la cepa silvestre. Por otra parte, no se detectó la proteína citosólica DnaK en ninguna de las muestras obtenidas de los sobrenadantes (**Figura 15A y 15D**). De esta forma, se concluye que SseJ-CyaA' se está expresando y que su detección en el medio de cultivo se debe a que fue secretada y no

liberada al medio de cultivo por lisis bacteriana. En el caso de las cepas mutantes con los sistemas de secreción deshabilitados (Figura 15C y 15D), se observó la presencia de la proteína de fusión tanto en el lisado total como en el sobrenadante de la mutante *ΔinvA* incubada en presencia de IPTG. En el caso de la mutante *ΔssaD*, la fusión se detectó asociada solamente al sedimento bacteriano, indicando que la proteína SseJ-CyaA' no se secretó al medio de cultivo. En conjunto, estos resultados indican que la proteína de fusión SseJ-CyaA' se secreta al medio de cultivo por medio del T3SS-2.

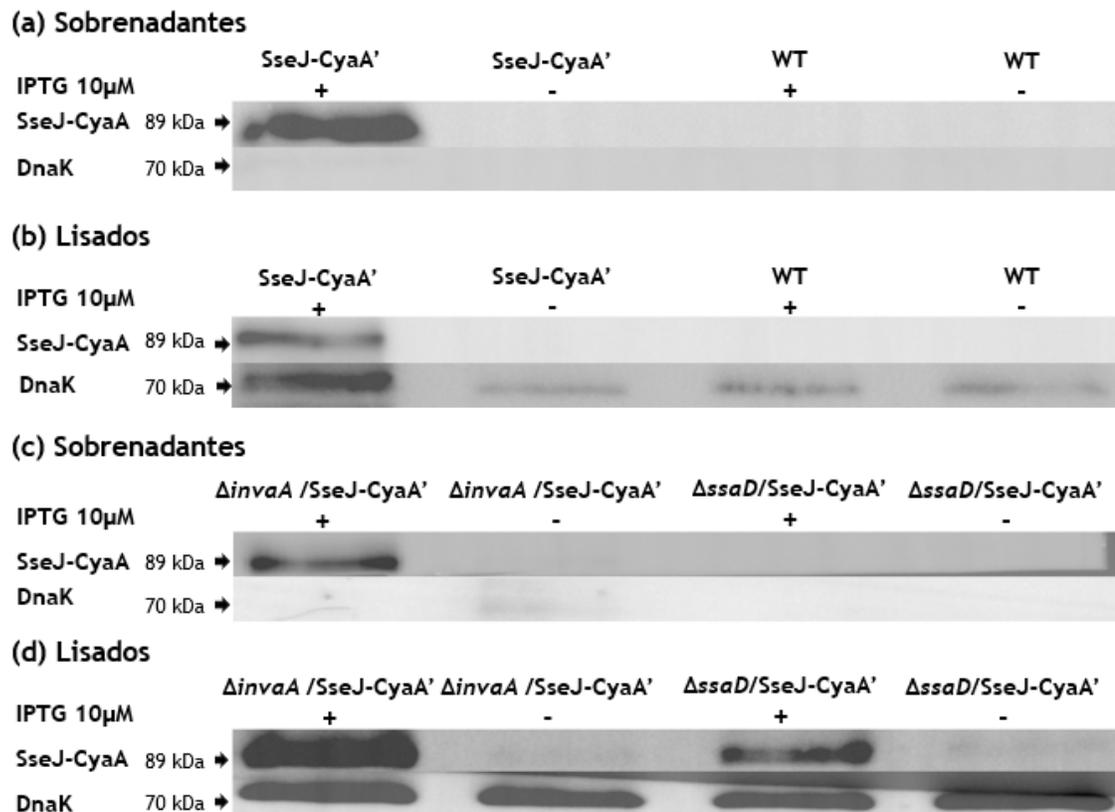


Figura 15. El efector SseJ es secretado al medio de cultivo mediante el T3SS-2. Inmunodetección de las proteínas SseJ-CyaA' y DnaK en sobrenadantes de cultivo de las cepas silvestre (WT) y SseJ-CyaA' (A) y en lisados de los sedimentos bacterianos de estos cultivos (B). Inmunodetección de las proteínas SseJ-CyaA' y DnaK en sobrenadantes de cultivo de las cepas *ΔinvA*/SseJ-CyaA' y *ΔssaD*/SseJ-CyaA' (C) y en lisados de los sedimentos bacterianos de estos cultivos (D).

6.4.- Translocación de la proteína SseJ durante la infección de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*

Se ha comprobado la translocación del efector SseJ al citoplasma de células hospederas eucariontes en otros modelos de infección mediante el uso de fusiones transcripcionales a dominios como CyaA' o HA (Miao y Miller, 2000; Niemann et al., 2010; Freeman et al., 2003), pero no en la interacción del *Salmonella* con *D. discoideum*. Estudios previos realizados por nuestro grupo han demostrado que *S. Typhimurium* requiere de los sistemas de secreción T3SS-1 y T3SS-2 y de algunos de sus efectores para sobrevivir en *D. discoideum* (Riquelme et al., 2016; Valenzuela et al., 2021). Es por esta razón que se ha hipotetizado que los efectores de estos sistemas de secreción tendrían un rol importante en la interacción de *S. Typhimurium* con *D. discoideum*, siendo el efector SseJ un candidato para evaluar su translocación al citoplasma de la ameba.

Con el fin de determinar si el efector SseJ es translocado través del T3SS-2 desde el citoplasma de *S. Typhimurium* al de *D. discoideum*, se generaron distintas cepas bacterianas derivadas de *S. Typhimurium* 14028s que expresan una fusión SseJ-CyaA' codificada en el cromosoma bacteriano. Cabe destacar que en todas estas cepas la expresión de la proteína de fusión SseJ-CyaA' se encuentra bajo el control de su promotor silvestre. Para determinar la translocación del efector SseJ se realizaron ensayos de infección, en que se evaluó la presencia de la proteína SseJ-CyaA' en la fracción citoplasmática de *D. discoideum* y en la fracción asociada a bacterias.

6.4.1.- Generación de la cepa portadora de la fusión génica *sseJ::cyaA'*-FRT y de las cepas mutantes $\Delta invA$ y $\Delta ssaD$ portadoras de la fusión

Se generó la cepa derivada de *S. Typhimurium* 14028s, *sseJ_cyaA'*-Kan mediante el método de remplazo alélico por recombinación de productos de PCR (Datsenko y Wanner, 2000). Para realizar la construcción de una fusión génica cromosomal que permite expresar *SseJ-CyaA'*, se amplificó la secuencia que contiene las secuencias que codifican el dominio *cyaA'* y el *cassette* de resistencia a kanamicina desde el *pCyaA'*-Kan (ver **Tabla 2**) utilizando partidores con regiones homólogas a las secuencias que flanquean el gen *sseJ*. Este producto se transformó en *S. Typhimurium* 14028s portadora del plasmidio *pKD46* (ver **Tabla 2**), el cual permite la expresión inducible de la recombinasa Red del fago λ . La recombinación del fragmento obtenido por PCR con las zonas homólogas en el genoma de *S. Typhimurium* permiten la generación de la fusión génica cromosomal del gen *sseJ* con *cyaA'* (Fernández et al., 2021).

Para generar las cepas *sseJ_cyaA'*-FRT, $\Delta invA/sseJ_cyaA'$ -FRT y $\Delta ssaD/sseJ_cyaA'$ -FRT, en primer lugar, se eliminó el *cassette* de resistencia a antibiótico de la cepa *sseJ_cyaA'*-Kan mediante la recombinasa Flp. La eliminación del *cassette* se confirmó mediante PCR de colonias. Una vez obtenida la cepa *sseJ_cyaA'*-FRT, se transdujeron los alelos mutantes $\Delta invA::Kan$ y $\Delta ssaD::Kan$ al fondo genético *sseJ::cyaA'*-FRT.

6.4.2.- Producción de la proteína de fusión SseJ-CyaA' desde las cepas *sseJ_cyaA'*-FRT, $\Delta invA/sseJ_cyaA'$ -FRT y $\Delta ssaD/sseJ_cyaA'$ -FRT

Para confirmar la expresión de la proteína de fusión SseJ-CyaA' bajo el control de su promotor silvestre, se realizaron cultivos de la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y las cepas *sseJ_cyaA'*-FRT, $\Delta invA/sseJ_cyaA'$ -FRT y $\Delta ssaD/sseJ_cyaA'$ -FRT bajo condiciones inductoras de la expresión de los genes asociados a las islas de patogenicidad SPI-1 y SPI-2 y se prepararon muestras de lisados bacterianos para la inmunodetección de la fusión.

Como se observa en la **Figura 16**, en todas las cepas portadoras de la fusión se inmunodetectó una proteína con el peso molecular esperado de ~89 kDa específicamente en las muestras provenientes de cultivos en condiciones inductoras de la SPI-2. En el caso de la cepa silvestre no se observaron bandas correspondientes a la proteína de fusión en ninguna de las condiciones de cultivo ensayadas (**Figura 16**). Estas observaciones indican que el alelo que codifica la fusión cromosomal responde a las señales ambientales que regulan la expresión del gen silvestre *sseJ* en *S. Typhimurium*.

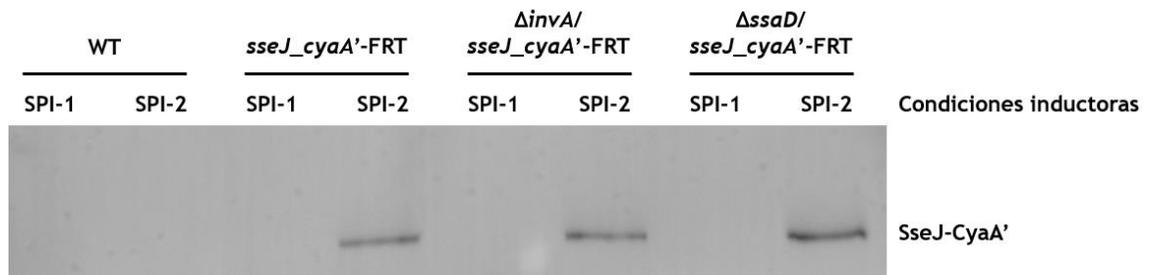


Figura 16. El efector SseJ es producido por *S. Typhimurium* bajo condiciones inductoras de los genes de la SPI-2. Inmunodetección de la proteína de fusión SseJ-CyaA' en lisados bacterianos de las cepas silvestre (WT), *sseJ_cyaA'*-FRT, $\Delta invA/sseJ_cyaA'$ -FRT y $\Delta ssaD/sseJ_cyaA'$ -FRT cultivadas en condiciones inductoras de la SPI-1 y SPI-2.

6.4.3.- Translocación de la proteína SseJ durante la infección de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*

Para caracterizar la translocación del efector SseJ al citoplasma de *D. discoideum*, se realizaron ensayos de infección de la ameba con las cepas bacterianas *sseJ_cyaA'*-FRT, $\Delta invA/sseJ_cyaA'$ -FRT y $\Delta ssaD/sseJ_cyaA'$ -FRT. Las amebas se co-incubaron con cada cepa bacteriana durante 3 y 6 h y posteriormente se lisaron las amebas infectadas. Realizado este procedimiento, se centrifugó para obtener dos tipos de muestras: los sobrenadantes, asociados a la fracción citoplasmática de *D. discoideum*, y los sedimentos, asociados a las bacterias procedentes desde el interior de la ameba o del medio extracelular. Luego, se detectó la proteína de fusión SseJ-CyaA' mediante *western blot* en ambas fracciones obtenidas.

Bajo las condiciones en las que se llevó a cabo el ensayo no se pudo determinar la translocación del efector SseJ de *S. Typhimurium* a *D. discoideum*, pues no se detectó la proteína de fusión en la fracción citoplasmática de ninguna de las infecciones con las distintas cepas en los tiempos ensayados (**Figura 17A**). Por otra parte, en la fracción asociada a los sedimentos bacterianos se observó la presencia de la proteína de fusión SseJ-CyaA' en todas muestras provenientes de infecciones llevadas a cabo con las cepas portadoras del alelo mutante (**Figura 17B**). No se detectó la proteína SseJ-CyaA' en los sedimentos de las infecciones realizadas con la cepa silvestre de *S. Typhimurium* o en la condición sin infectar, en ninguno de los dos tiempos ensayados. En la fracción de sedimentos asociados a bacterias, la proteína chaperona citoplasmática DnaK no se detectó en la condición sin infectar, pero sí se detectó en la fracción asociada a los sedimentos bacterianos de todas las cepas ensayadas, tanto en los tiempos de 3 y 6 h

post infección (**Figura 17B**), demostrando la presencia de bacterias en dicha fracción. Por su parte, DnaK no se detectó en la fracción citoplasmática, por lo que se confirma la ausencia de bacterias en la fracción asociada a citoplasma del hospedero.

Cabe destacar que en la **Figura 17** se observa una mayor intensidad de las bandas de SseJ-CyaA' provenientes de las muestras de lisados obtenidas a las 6 h post infección con respecto a las del tiempo de 3 h post infección. La biomasa utilizada para generar ambas muestras fue la misma, por lo que existe una mayor cantidad de la proteína SseJ-CyaA' a tiempos más largos post infección.

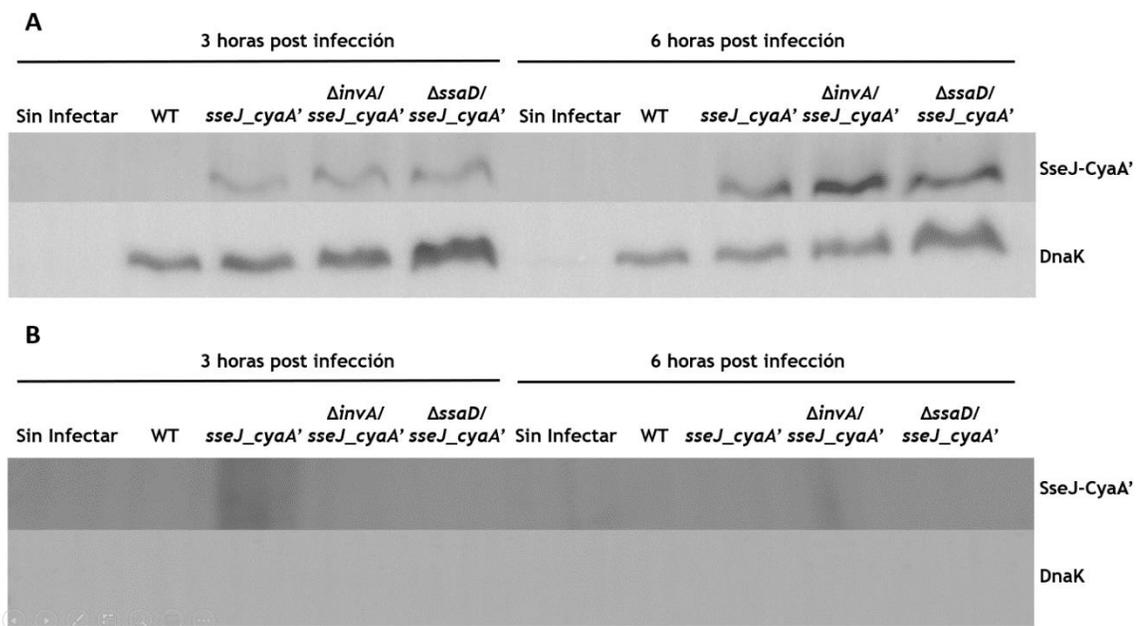


Figura 17. El efector SseJ es expresado por *S. Typhimurium* durante la infección de *D. discoideum*. Las amebas fueron infectadas con las cepas silvestre (WT), *sseJ_cyaA'*-FRT, $\Delta invA/sseJ_cyaA'$ -FRT y $\Delta ssaD/sseJ_cyaA'$ -FRT y luego de 3 y 6 h post infección se lisaron las amebas, se recuperó la fracción asociada al citoplasma de *D. discoideum*, dónde no se detectó la proteína de fusión (**B**) y los sedimentos asociados a bacterias, en dónde la fusión se detectó en todas las cepas portadoras del plasmidio luego de 3 y 6 h post infección (**A**).

Puesto que la proteína de fusión SseJ-CyaA' sólo se produce en condiciones inductoras de la expresión de los genes de la SPI-2, tal como se demuestra en la **Figura 16**, los resultados presentados indican que el efector SseJ es producido cuando la bacteria se encuentra dentro de la ameba, demostrando que *D. discoideum* entrega las señales ambientales necesarias para que los genes asociados a la SPI-2 sean expresados durante el proceso infeccioso.

6.5.- Efecto de SseJ sobre la internalización y supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*

Existen antecedentes en la literatura que indican que el efector SseJ tendría un papel importante en la supervivencia intracelular de *Salmonella* en el hospedero, pues una mutante $\Delta sseJ$ de *S. Typhimurium* presenta un defecto en la replicación intracelular en macrófagos murinos. Por esta razón, se decidió investigar la importancia del gen *sseJ* en la internalización y supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* al interior de *D. discoideum* durante la infección.

Para esto, se generó una cepa mutante por delección del gen *sseJ* mediante el método de remplazo alélico por recombinación de productos de PCR (Datsenko y Wanner, 2000). La mutación del gen *sseJ* se confirmó mediante PCR de colonias utilizando los partidores *sseJ_out5* y *sseJ_out3*, con los cuales se obtuvo productos esperados de 1514 pb para la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y de 1960 pb para la cepa mutante $\Delta sseJ$ (**Figura 18**).

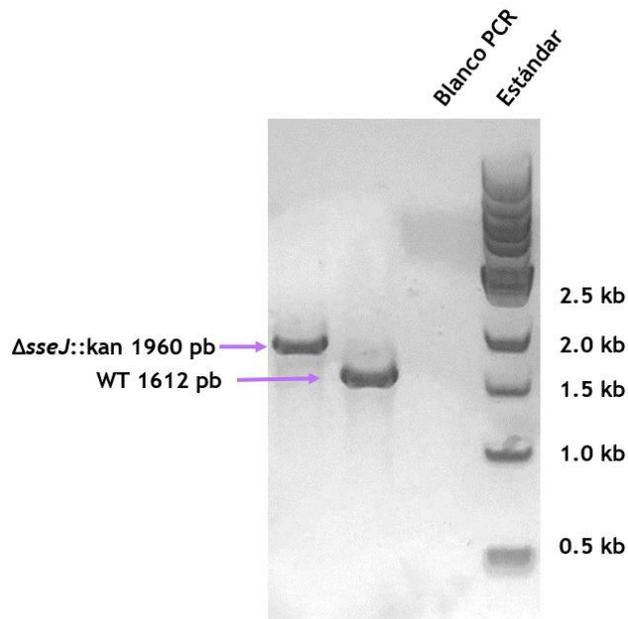


Figura 18. Confirmación de la generación de la cepa mutante Δ sseJ de *S. Typhimurium* mediante PCR de colonias. Se obtuvo los productos esperados de 1960 pb en el caso de la cepa mutante y de 1612 pb en el caso de la cepa silvestre, confirmando el reemplazo alélico.

Una vez construida la cepa mutante Δ sseJ, se realizaron ensayos de competencia *in vitro* en *D. discoideum*. Para esto, se infectó a la cepa silvestre AX4 de *D. discoideum* con mezclas en proporción 1:1 de la cepa silvestre con la mutante Δ sseJ, o con la mutante Δ aroA. Esta última se utilizó como control ya que presenta defectos de supervivencia intracelular en distintos modelos de infección, incluyendo a *D. discoideum* (Riquelme et al., 2016). Luego, se analizó la internalización y se evaluó la supervivencia intracelular de las cepas luego de 1, 3 y 6 h de infección. Esto se realizó mediante la recuperación de las bacterias intracelulares y su recuento por dilución seriada y siembra en placas de agar LB y LB suplementado con Kan. En el recuento de las colonias cultivadas en la placa de agar LB sin suplementar se obtuvieron las UFC totales y de las colonias cultivadas en las placas de agar LB suplementado con

Kan se obtuvieron las UFC correspondientes a la cepa $\Delta sseJ$ o $\Delta aroA$ (ver **Sección 5.14.1**). Con los valores obtenidos, se calculó el índice de competencia (IC) utilizando la fórmula descrita en la **Sección 5.14.2** y los datos se expresaron como $\text{Log}_{10}(\text{IC})$. De esta forma, un valor de $\text{Log}_{10}(\text{IC})$ es mayor a 0 indica que la cepa mutante sobrevive o invade más que la cepa silvestre. Por el contrario, si el valor de $\text{Log}_{10}(\text{IC})$ es menor a 0, la cepa mutante sobrevive o invade menos que la cepa silvestre. Finalmente, si un valor de $\text{Log}_{10}(\text{IC})$ es igual a 0 indica que la cepa mutante sobrevive o invade de igual forma que la cepa silvestre.

Los datos obtenidos muestran una disminución significativa en la internalización relativa de la mutante $\Delta sseJ$ con respecto a la cepa silvestre, siendo la población de la mutante internalizada aproximadamente la mitad de la población de la cepa silvestre (**Figura 19A**). Esto indica que el efector SseJ es requerido para la internalización de *S. Typhimurium* en *D. discoideum* en los ensayos de competencia descritos. Por el contrario, la cepa mutante $\Delta aroA$ no exhibió diferencias en sus niveles de internalización con respecto a la cepa silvestre (**Figura 19A**). De esta forma, los resultados obtenidos en este ensayo sugieren que la ausencia de este gen no afectaría a la internalización de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*.

En el caso de la supervivencia intracelular a los tiempos ensayados, se observó que la cepa mutante $\Delta sseJ$ exhibe una supervivencia intracelular deficiente en *D. discoideum* luego de 1 y 6 h de infección (**Figura 19B**). De hecho, luego de 1 h de infección la mutante $\Delta sseJ$ sobrevivió aproximadamente dos veces menos que la cepa silvestre. Este fenotipo atenuado también se observó luego de 6 h de infección, siendo la supervivencia de la cepa mutante $\Delta sseJ$ aproximadamente dos y media veces menos

que la de la cepa silvestre. A pesar de los resultados obtenidos en los otros tiempos ensayados, no se observa una diferencia de supervivencia significativa entre la cepa mutante $\Delta sseJ$ y la cepa silvestre a las 3 h post infección (**Figura 19B**). En base a los resultados obtenidos, se concluye que el efector SseJ es requerido para la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum* a los tiempos mencionados, por lo que el rol que cumple el efector SseJ durante la infección sería crucial en la supervivencia de *Salmonella* en el modelo descrito. Como era de esperar, en el caso de la mutante $\Delta aroA$ se observó una supervivencia intracelular disminuida a las 3 y 6 h post infección (**Figura 19B**). En el caso del tiempo 3 h, la mutante $\Delta aroA$ sobrevivió cerca de 6 veces menos que la cepa silvestre, presentando el mismo comportamiento a las 6 h post infección, por lo que el producto del gen *aroA* sería requerido para la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*. Los resultados obtenidos para esta mutante resultan concordantes con lo anteriormente descrito por otros trabajos realizados en nuestro laboratorio (Riquelme et al., 2016).

Finalmente, observamos que las poblaciones de amebas viables se mantuvieron constantes durante los ensayos de competencia realizados (**Figura 19C**), indicando que las cepas bacterianas utilizadas no generan un daño celular a los tiempos ensayados. Además, esto indica que los fenotipos atenuados observados no son producto de una menor recuperación de bacterias intracelulares, producto de un menor número de células viables de *D. discoideum*.

Analizados en conjunto, estos resultados demuestran la importancia del efector SseJ de *S. Typhimurium* en la invasión y supervivencia intracelular de la bacteria en la ameba *D. discoideum*.

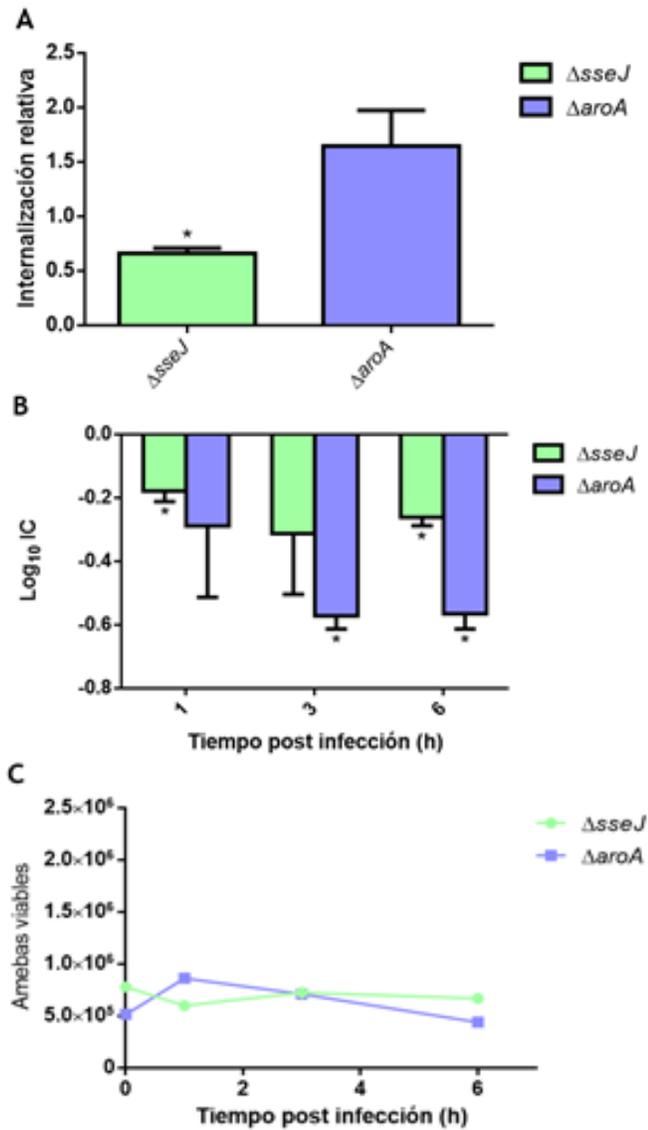


Figura 19. Contribución del efector SseJ en la internalización y supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*. (A) La internalización relativa de las mutantes $\Delta sseJ$ y $\Delta aroA$ respecto a la cepa silvestre se calculó como $(UFC_{mutante}/UFC_{wt})_{t0}/(UFC_{mutante}/UFC_{wt})_{in\acute{o}culo}$. (B) La supervivencia intracelular de las mutantes $\Delta sseJ$ y $\Delta aroA$ se calculó como $(UFC_{mutante}/UFC_{wt})_{tx}/(UFC_{mutante}/UFC_{wt})_{t0}$ y se expresó como Log_{10} . Todos los valores muestran el promedio de al menos tres réplicas biológicas \pm el error estándar de la media (SEM). La significancia estadística se determinó utilizando un test *t* de Student de dos colas (* = $P < 0,05$). (C) Recuento de amebas viables totales durante los ensayos de infección.

7.- DISCUSIÓN

Salmonella Typhimurium es una bacteria patógena de importancia para la salud pública debido a que es uno de los principales agentes causantes de enteritis a nivel mundial. Cuando *Salmonella* es adquirida mediante la vía fecal-oral a través del consumo de alimentos y agua contaminados, coloniza el intestino delgado, donde invade y sobrevive al interior del tejido epitelial. Una vez internalizada, *S. Typhimurium* cruza la barrera epitelial intestinal e interactúa con células fagocíticas profesionales del sistema inmunitario, causando una respuesta inflamatoria local que desencadena la liberación de *Salmonella* al medio ambiente. La patogenicidad de *Salmonella* se debe principalmente a su capacidad de sobrevivir dentro de células fagocíticas profesionales como macrófagos, polimorfonucleares y células dendríticas, las cuales participarían como vectores de diseminación dentro de un hospedero infectado. En la literatura se han descrito en detalle los mecanismos utilizados por *Salmonella* para adaptarse a las condiciones adversas dentro de los macrófagos, entre los cuales destacan diversos factores de virulencia como los T3SS-1 y T3SS-2. Sin embargo, el rol de estos factores en otros estadios del ciclo infeccioso de *Salmonella* ha sido menos caracterizado.

En su ciclo de vida de *Salmonella* se ve expuesta al medio ambiente, donde interactúa con diversos organismos, incluyendo plantas, otras bacterias, hongos y protozoos. Las amebas se encuentran dentro de la familia de los protozoos. Estos organismos son células eucariontes unicelulares que viven en suelos de bosques y cursos de agua y se alimentan de bacterias y hongos mediante mecanismos de fagocitosis

similares a las células fagocíticas profesionales de mamíferos. En la literatura se ha demostrado que diferentes bacterias (por ejemplo *L. pneumophila* y especies de *Mycobacterium*) utilizan mecanismos moleculares similares para sobrevivir dentro de macrófagos murinos y amebas (Salah et al., 2009; Escoll et al., 2013).

Salmonella utiliza los T3SS codificados en las SPI-1 y SPI-2 y sus proteínas efectoras para invadir y sobrevivir dentro de hospederos eucariontes, entre ellos la ameba *D. discoideum*. Se ha demostrado que *Salmonella* es capaz de invadir y sobrevivir al interior de la ameba dentro de un compartimento vacuolar. Los efectores SifA y SopB son fundamentales para la supervivencia de *Salmonella* al interior de *D. discoideum* y para la generación de una SCV madura en este organismo (Valenzuela et al., 2020). Recientemente, en nuestro grupo también se ha evaluado la importancia de distintos efectores de los T3SS en la supervivencia de *Salmonella* en *D. discoideum*, siendo relevantes los efectores SopF y SipA, secretados por el T3SS-1, y los efectores SseG y SseF, secretados por el T3SS-2 (Vera, 2020; Ortega, 2021). Dichos estudios también han demostrado la importancia de los efectores SopF, SseG y SseF en la dinámica del compartimento vacuolar donde reside *Salmonella*, y en los procesos autofágicos, en el caso de los efectores SopB, SptP y SteC, (Salas, 2019; Urrutia et al., 2018). En consecuencia, es evidente el importante rol de los efectores de los T3SS en los mecanismos moleculares involucrados en la supervivencia y mantención de la bacteria la interior de la ameba. Los efectores secretados a través del T3SS-2 son especialmente relevantes en la biogénesis y maduración de la SCV en distintos hospederos. El estudio del rol de estos efectores es crucial para la comprensión de los mecanismos utilizados por *Salmonella* para sobrevivir en *D. discoideum* y, por lo tanto, tener un conocimiento

más acabado de la interacción de la bacteria con hospederos no humanos en el medio ambiente.

7.1.- Producción de la proteína efectora SseJ de *Salmonella* Typhimurium y secreción al medio de cultivo

La secreción y translocación de las proteínas efectoras de *Salmonella* ha sido ampliamente estudiada, siendo SseJ uno de los efectores mejor caracterizados. La secreción y translocación de SseJ es dependiente del T3SS-2 y esto ha sido demostrado gracias al uso de distintos dominios de proteínas fusionados al efector. Entre ellos la fusión a HA para analizar la secreción al medio de cultivo mediante inmunodetección (Yu et al., 2010; Niemann et al., 2011; Yu *et. al*, 2018) y CyaA' en el caso de la translocación al citoplasma del hospedero mediante la medición de los niveles de AMPc (Miao y Miller, 2000). Sin embargo, el estudio de la secreción de SseJ al medio de cultivo mediante fusiones a CyaA' no ha sido reportada en la literatura.

Con la intención de demostrar la producción y secreción del efector del T3SS-2 al medio de cultivo y su translocación al citoplasma de *D. discoideum*, se construyó una fusión de SseJ a CyaA', generándose las cepas derivadas de *S. Typhimurium* portadoras de construcciones génicas, una plasmidial y otra cromosomal, que permitirían la caracterización de la translocación del efector al citoplasma de la ameba. Para ambos tipos de construcciones, también se utilizaron cepas portadoras de mutaciones en los genes *invA* y *ssaD*, los cuales codifican componentes estructurales esenciales de los T3SS-1 y T3SS-2, respectivamente. De esta forma, estas mutantes carecerían de la capacidad de secretar y translocar sus respectivos efectores, por lo que son de utilidad para determinar el T3SS por el cual es secretada una proteína efectora.

En primera instancia, se construyó el plasmidio pMMB207::*sseJ-cyaA'*, con el cual se transformó a la cepa silvestre de *S. Typhimurium* 14028s. Este plasmidio porta las secuencias necesarias para la producción de la proteína SseJ-CyaA' cuando la cepa se encuentra en presencia de IPTG (**Figura 14**). Se logró detectar la proteína de fusión mediante *western blot*, fenotipo atribuible a la presencia del plasmidio y de IPTG en el medio de cultivo, pues dicho patrón de banda no se inmunodetectó en la cepa portadora del plasmidio cultivada en ausencia de IPTG y en la cepa silvestre no portadora del plasmidio. Además, durante la inmunodetección de la fusión SseJ-CyaA' se observaron bandas de interacción inespecífica solamente en la cepa portadora del plasmidio inducidas con IPTG. Dichas bandas son atribuibles a la producción de la proteína de fusión y no a la interacción del anticuerpo con otra proteína bacteriana, pues en ese caso se observarían bandas inespecíficas también en la cepa silvestre y en la cepa portadora del plasmidio cultivada en ausencia de IPTG. Al ser estas bandas de una masa molecular menor a la proteína de fusión, podrían deberse a la detección de algún producto de degradación proteolítica del antígeno utilizado y/o de la proteína de fusión. También se concluyó que estas bandas inesperadas son atribuibles al anticuerpo primario, pues en un experimento control se realizó la incubación de las muestras de lisados de cultivos suplementados con IPTG únicamente con el anticuerpo secundario, sin obtenerse señal alguna al revelar (datos no incluidos).

La proteína SseJ-CyaA' producida desde el plasmidio pMMB207::*sseJ-cyaA'* también se secretó al medio de cultivo de forma dependiente del T3SS-2 (**Figura 15**). La proteína de interés se detectó en los sobrenadantes de cultivo de la cepa silvestre y de la mutante *ΔinvA* transformadas con el plasmidio, no así en la mutante *ΔssaD*

transformada con el plasmidio. Interesantemente, estos experimentos se realizaron en medio rico y aun así se observó secreción del efector SseJ al medio de cultivo. La expresión de los genes asociados a los T3SS se realiza en condiciones de cultivos específicas (ver **Sección 5.10.1**): la de los genes asociados a la SPI-2 específicamente, en carencia de nutrientes y a pH levemente ácido. El hecho que SseJ sea secretado al medio de cultivo en las condiciones ensayadas y que esta secreción sea dependiente del T3SS-2 indicaría que hay una producción basal de los componentes del T3SS-2 en las condiciones experimentales evaluadas.

Con respecto a las fusiones cromosomales, éstas se generaron mediante una metodología desarrollada en nuestro laboratorio para obtener fusiones a efectores carentes de marcador de selección (Fernández et al., 2021). La ventaja de escindir el marcador de selección de las secuencias que portan la fusión es que se evitan los posibles efectos polares indeseados debido a la sobreexpresión del marcador de selección. Esto es particularmente útil para fusiones generadas en alelos ubicados en operones. En el caso de la proteína SseJ, ésta se encuentra codificada en el gen *sseJ* (*STM14_1974*) localizado fuera de la SPI-2, por lo que es improbable que la presencia del marcador de selección generara efectos polares indeseados. Sin embargo, se decidió retirar el *cassette* de resistencia a Kan de la cepa *sseJ_cyaA'*-Kan, pues el mismo marcador de selección se encuentra presente en las cepas $\Delta invA::Kan$ y $\Delta ssaD::Kan$, por lo que la presencia de este en la cepa receptora impediría una selección efectiva de las transductantes al cultivarlas en placas de agar LB suplementadas con Kan (ver **Sección 5.9.2.3**).

Se confirmó la producción de la proteína SseJ-CyaA' a partir de la fusión cromosomal en condiciones inductoras de los genes de la SPI-2 (**Figura 16**). Estos resultados indican que, como se esperaba, el alelo que codifica la fusión responde a las señales ambientales que regulan la expresión del gen *sseJ* silvestre en *S. Typhimurium*. Si bien, se corroboró la producción de este efector mediante la inducción de los genes de la SPI-2, no se detectó la fusión en ensayos de secreción *in vitro* llevados a cabo con las cepas portadoras de la fusión cromosomal (datos no mostrados). Con este fin se utilizaron dos metodologías distintas: mediante la obtención de proteínas de los sobrenadantes recuperados de los cultivos bacterianos realizados (ver **Sección 5.10.1**) y según la metodología descrita por Yu y colaboradores (Yu et al., 2010), con algunas modificaciones. En este trabajo se postula que *Salmonella* induce la translocación de los efectores del T3SS-2 mediante la detección de los cambios de pH en el medio. El modelo de los mecanismos de ensamblaje del T3SS-2 y la secreción de sus proteínas efectoras contempla que la secreción de éstos no ocurre hasta que *Salmonella* detecta un cambio de pH en el medio. Dentro de la SCV, la bacteria está expuesta a pH moderadamente ácido (pH 5.0), señal que induce la expresión de los componentes estructurales del T3SS-2. A este pH se ensambla el cuerpo basal del sistema de secreción, la aguja y el translocón, mientras que la secreción de los efectores se reprime. Una vez formado el translocón, la bacteria detecta el pH cercano al neutro del citoplasma de la célula hospedera (pH 7.2) mediante un mecanismo desconocido y se desencadena la translocación de los efectores. La estimulación de este proceso puede realizarse *in vitro* exponiendo a la bacteria a pH 5,0 para inducir el ensamblaje del T3SS y la secreción de las proteínas del translocón, para posteriormente aumentar el pH del ambiente a 7.2, suprimiendo

la secreción del translocón y permitiendo la secreción de las proteínas efectoras (Yu et al., 2010). En los resultados del estudio mencionado se utilizó una fusión de SseJ a HA, demostrando su secreción al medio de cultivo realizando el cambio de pH descrito. La misma metodología se utilizó para evaluar la secreción de la fusión SseJ-CyaA' en esta tesis, pero desafortunadamente no se logró inmunodetectar la fusión en los sobrenadantes de los cultivos (datos no mostrados). Al compararse los resultados obtenidos por Yu y colaboradores (Yu et al., 2010; Yu et al., 2018) con los obtenidos en esta tesis (**Figura 16**), se observa que la cantidad de fusión detectada en los lisados bacterianos obtenidos en este trabajo es mucho menor que la reportada en la literatura citada, considerando, además, que la biomasa utilizada en las publicaciones de Yu es la mitad de la utilizada en esta tesis. Esta producción disminuida de la proteína SseJ-CyaA' podría explicar el que no detectado la proteína en los sobrenadantes de cultivo. Esta hipótesis también podría sustentarse en el hecho que en los experimentos de secreción *in vitro* realizados con las cepas portadoras del plasmidio pMMB207::*sseJ-cyaA'*, en los que sí se detectó la proteína de fusión SseJ-CyaA' en los sobrenadantes de cultivo, se reveló una mayor cantidad de la fusión en los lisados bacterianos (la biomasa utilizada en los lisados de ambos ensayos fue la misma). De esta forma, habría una mayor secreción de SseJ debido a la mayor cantidad de proteína producida. Por otra parte, las condiciones inductoras de los genes de la SPI-2 utilizadas en nuestro laboratorio contemplan el uso de medio mínimo N ajustado a pH 5,8, por lo que el cambio de pH utilizado en esta tesis fue de 5.8 a 7.2. En el caso del trabajo de Yu, el medio de cultivo utilizado fue MgM-MES ajustado a pH 5.0, el cual contiene los mismos componentes que el medio mínimo N, pero en concentraciones levemente distintas. Podría ser que el pH utilizado al inicio de nuestro experimento no fuera lo

suficientemente ácido para inducir una expresión mayor de los genes asociados al T3SS-2 o que la diferencia en la concentración de sales entre el medio mínimo N y el MgM-MES hiciera la diferencia al momento de inducir la expresión de los genes asociados al T3SS-2. Otro factor para considerar es el epítotope utilizado para generar la fusión al efector. En el caso del trabajo de Yu, el epítotope utilizado fue HA, por lo que podría ser que la diferencia entre ambos HA y CyaA' afectara la secreción a través del aparato del T3SS-2, aunque a juzgar por los resultados obtenidos en los ensayos de secreción *in vitro* utilizando las cepas portadoras del plasmidio pMMB207::*sseJ-cyaA'*. Este factor podría descartarse, pues en este caso se observa una inmunodetección de la fusión en el medio de cultivo, lo cual está asociado a la secreción del efector a través del T3SS-2. De todas maneras, sería interesante caracterizar la secreción *in vitro* de una fusión de efectores a CyaA', emulando de manera más rigurosa las condiciones descritas en la literatura.

7.2.- Translocación de la proteína efectora SseJ de *S. Typhimurium* al citoplasma de *D. discoideum*

Uno de los objetivos del presente trabajo fue evaluar la translocación del efector SseJ de *S. Typhimurium* al citoplasma de *D. discoideum* mediante la inmunodetección de la fusión SseJ-CyaA' en la fracción citoplasmática obtenida a partir de una infección de la ameba con la bacteria.

La translocación dependiente del T3SS-2 del efector SseJ se demostró por primera vez utilizando una fusión a CyaA' durante la infección macrófagos RAW264.7 con *S. Typhimurium*, donde se evaluaron los niveles de AMPc para determinar la translocación (Miao y Miller, 2000). Posteriormente, el uso de una fusión de SseJ a HA

permitió evaluar la translocación a células HeLa y macrófagos RAW264.7 mediante inmunofluorescencia, confirmando que el efector se localiza en la cara externa de la membrana de la SCV durante la infección (Freeman et al., 2003). Por otra parte, el uso de una fusión CyaA' a proteínas efectoras de *Legionella pneumophila* permitió la evaluación de su translocación al citoplasma de *D. discoideum* mediante la medición de los niveles de AMPc (de Felipe et al., 2005).

En nuestro laboratorio también se utilizaron fusiones de efectores de los T3SS a CyaA' para evaluar su translocación al citoplasma de *D. discoideum* mediante la medición de los niveles de AMPc (Salas, 2019). Estos antecedentes demuestran la utilidad de la estrategia del uso de fusiones de CyaA' a efectores de distintos sistemas de secreción para evaluar su translocación a *D. discoideum* durante la infección. En este trabajo, se decidió utilizar la estrategia de la inmunodetección de la fusión SseJ-CyaA' en la fracción citoplasmática de *D. discoideum* durante la infección. Lamentablemente, en las condiciones ensayadas que se utilizaron en este trabajo no se pudo confirmar una efectiva translocación, pues no se inmunodetectó el epítipo CyaA' en la fracción citoplasmática obtenida tras la lisis de las amebas (**Figura 17**). Esto pudo deberse principalmente a que el tampón de lisis utilizado para obtener la fracción citoplasmática de la ameba no fue suplementado con inhibidores de proteasas, provocando la degradación de la proteína de fusión mediante las proteasas citoplasmáticas de *D. discoideum*. De todas formas, se han utilizado otros epítopos para evaluar la translocación de efectores de los T3SS de *Salmonella* mediante la inmunodetección de fusiones en el citoplasma del hospedero (Cardenal-Muñoz y Ramos-Morales, 2011), por lo que esta estrategia sería factible bajo las condiciones

experimentales adecuadas. Para lograr este objetivo, es necesario ajustar el protocolo a una metodología que permita la extracción de proteínas citoplasmáticas de *D. discoideum*, generando una muestra adecuada para su análisis mediante a *western blot*. Si bien no se pudo determinar la translocación del efector SseJ utilizando las condiciones descritas, en los ensayos de supervivencia intracelular (ver **Sección 5.14**) se determinó que una mutante $\Delta sseJ$ sobrevive menos que la cepa silvestre durante la infección de *D. discoideum* con *S. Typhimurium*, por lo que el efector SseJ es importante para la supervivencia intracelular de la bacteria en la ameba (**Figura 19B**). Este fenotipo indica un rol de esta proteína durante la infección. Este rol depende de la translocación del efector, por lo que se esperaría que SseJ sea translocado al citoplasma de la ameba para cumplir la función que resulta relevante para la supervivencia intracelular de la bacteria durante la infección de *D. discoideum*.

Por otra parte, se inmunodetectó la fusión SseJ-CyaA' en la fracción asociada a los sedimentos bacterianos recuperados desde las co-incubaciones. Puesto que la fusión sólo se produce en condiciones inductoras de la expresión de los genes de la SPI-2, tal como se demuestra en la **Figura 17**, los resultados obtenidos indican que el efector SseJ se expresa cuando la bacteria se encuentra dentro de la ameba. Esto demuestra que *D. discoideum* entrega las señales ambientales suficientes para que el gen *sseJ* se exprese. Debido a que las señales que inducen la expresión de dicho gen son las mismas requeridas para que se expresen los genes asociados a la SPI-2, junto con la evidencia que una mutante con el T3SS-2 deshabilitado presenta un defecto en la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum* (Riquelme et al.,2016), podría deducirse que el T3SS-2 es ensamblado al interior de la ameba y que es fundamental

para la supervivencia intracelular de la bacteria. Estos antecedentes, junto con la evidencia de la importancia del efector SseJ en la supervivencia intracelular de *Salmonella* en la ameba y a que existe producción de éste efector durante la infección, sugieren fuertemente que el efector SseJ es producido y translocado al citoplasma de *D. discoideum* durante la infección.

Además, se observa una mayor cantidad de la proteína SseJ-CyaA' luego de 6 h post infección, con respecto a lo observado en las muestras obtenidas luego de 3 h post infección. Esto se debe principalmente a que después de 6 h luego de infectar, existe una mayor cantidad de bacterias internalizadas, existiendo una mayor población de bacterias sometidas a las condiciones ambientales necesarias para la producción de SseJ-CyaA'.

7.3.- Rol del efector SseJ en la internalización de *S. Typhimurium* en *D. discoideum* durante la infección

Para analizar la contribución de la proteína efectora SseJ en la internalización de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*, se realizaron ensayos de competencia con una mezcla 1:1 la cepa silvestre con la cepa mutante Δ sseJ. Según los resultados obtenidos, la cepa mutante se internaliza aproximadamente la mitad de lo que se internaliza la cepa silvestre (**Figura 19A**). De esta manera, se concluye que el efector SseJ sería necesario para la internalización de *S. Typhimurium* en la ameba. Este resultado es llamativo considerando que SseJ es un efector secretado por el T3SS-2, por lo cual está relacionado con procesos que ocurren una vez internalizada la bacteria en la célula hospedera, es decir, a tiempos más tardíos luego de la infección. Por esta razón, resultaría interesante analizar otros mecanismos asociados al efector, sobre todo en

etapas tempranas de la interacción de *Salmonella* con *D. discoideum* y con otros hospederos eucariontes. Por otra parte, la cepa mutante Δ aroA presentó una internalización relativa comparable con la cepa silvestre (**Figura 19A**), por lo que ambas cepas se internalizan en igual medida. Los resultados obtenidos para la mutante Δ aroA son concordantes con otros estudios realizados en el laboratorio (Riquelme et al., 2016).

Según los resultados obtenidos, el efector SseJ estaría involucrado en la internalización de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*. Sin embargo, para confirmar estas observaciones lo ideal hubiera sido realizar experimentos con la cepa mutante Δ sseJ complementada en *trans*, lo cual permitiría confirmar que la deficiencia en la internalización relativa observada es consecuencia de la delección del gen *sseJ*.

7.4.- Contribución del efector SseJ en la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*

El análisis de la supervivencia intracelular de una cepa bacteriana con una delección de un gen específico mediante ensayos de infección de un hospedero resulta de vital importancia para la comprensión del rol del producto de ese gen durante la infección. Gracias a estos ensayos de supervivencia se ha logrado identificar distintos factores de virulencia relevantes durante la infección. Uno de estos factores es el gen *sseJ*, el cual ha demostrado tener un rol en la supervivencia de *S. Typhimurium* en distintos hospederos eucariontes. Esa importancia se evidencia en una supervivencia deficiente de la mutante Δ sseJ de *S. Typhimurium* en macrófagos murinos (Ruiz-Albert et al., 2002; Freeman et al., 2003; Figueira et al., 2013) y en un fenotipo atenuado

durante la infección en ratones (Freeman et al., 2003; Ohlson et al., 2005), demostrando la importancia del efector SseJ en la supervivencia de *Salmonella* al interior del hospedero.

En nuestro laboratorio se han utilizado ampliamente los ensayos de supervivencia para dilucidar el rol de distintos genes durante la infección de la ameba *D. discoideum*. De esta manera, se ha revelado la importancia de los T3SS-1 y T3SS-2 y de algunos de sus efectores en la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en la ameba. En este estudio se evaluó la importancia del efector SseJ en la supervivencia intracelular durante la interacción de la bacteria con la ameba.

Para evaluar el rol del efector SseJ en la supervivencia de *Salmonella* en *D. discoideum*, se realizaron ensayos de infección por competencia entre la mutante Δ sseJ y la cepa silvestre de *S. Typhimurium*. En los resultados obtenidos, la mutante mostró una supervivencia intracelular deficiente luego de 1 y 6 h de infección (**Figura 19B**). Una hora luego de la infección la mutante Δ sseJ sobrevivió aproximadamente dos veces menos que la cepa silvestre. Este menor título de mutantes intracelulares a tiempos cortos post infección puede deberse a la internalización disminuida que presenta la bacteria con respecto a la cepa silvestre (**Figura 19A**) y al rol que tendría este efector durante tiempos tempranos de la infección. Posiblemente, al ser un efector que participa en la biogénesis y establecimiento de la SCV mediante la modificación de los lípidos del hospedero, se impediría un normal desarrollo y establecimiento de este compartimento, comprometiendo la supervivencia de *Salmonella* al interior del hospedero al no encontrarse al interior de un nicho replicativo óptimo. A las 6 h transcurridas luego de la infección se observó que la

mutante $\Delta sseJ$ sobrevive aproximadamente 2,5 veces menos que la cepa silvestre, evidenciando una supervivencia intracelular deficiente a tiempos más largos de infección. SseJ participa activamente de la consolidación de la SCV y de la formación de SIFs, estructuras membranosas establecidas como una red que permiten el acceso de la bacteria a nutrientes indispensables para su supervivencia cuando se encuentra al interior de la SCV (Liss et al., 2017). Podría hipotetizarse que este fenómeno observado en otras células fagocíticas, como macrófagos RAW264.7, también ocurre al interior de la ameba y, de la misma forma, al no consolidarse la red de estructuras membranosas que le permiten el acceso a *Salmonella* a nutrientes debido a la ausencia del efector SseJ, la bacteria tendría problemas para sobrevivir intracelularmente a tiempos más largos post infección. Finalmente, la menor supervivencia intracelular que presenta la mutante $\Delta sseJ$ al interior de la ameba *D. discoideum* podría deberse a fallas en el establecimiento de la SCV como nicho replicativo y a la falta de acceso a nutrientes por parte de la bacteria debido a defectos en el establecimiento de las redes de estructuras membranosas que le permiten sobrevivir al interior de la SCV.

En el caso de la mutante $\Delta aroA$, se observó una menor supervivencia a las 3 y 6 h post infección. Esta cepa mutante presenta deficiencias en la biosíntesis de compuestos aromáticos y defectos estructurales en la pared celular y en la membrana externa, que finalmente causan defectos en la supervivencia intracelular en distintos modelos de infección previamente descritos (Ruiz-Albert et al., 2002; Freeman et al., 2003; Figueira et al., 2013). Estos resultados son concordantes con estudios previos del laboratorio (Riquelme et al., 2016; Urrutia et al., 2018), validando los ensayos realizados en este trabajo.

Finalmente, los resultados presentados indican que *SseJ* es requerido para la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*. Sin embargo, para corroborar este fenotipo es necesario realizar experimentos adicionales con la cepa mutante complementada en *trans*. Esta complementación evidenciaría si la deficiencia en la supervivencia intracelular de la cepa mutante Δ *sseJ* de *S. Typhimurium* es producida por la delección del gen *sseJ*, pues se observaría una recuperación de la supervivencia intracelular de la bacteria.

En consecuencia, con los datos presentados, este trabajo permite describir de manera más acabada el uso de proteínas de fusión para caracterizar la secreción y translocación de proteínas efectoras de los T3SS. Por otra parte, el conocimiento más detallado de la interacción de *S. Typhimurium* con amebas, resulta de utilidad para comprender el ciclo de vida de *Salmonella* en el medio ambiente. La potencial importancia de la generación de estos antecedentes radica en la posibilidad del desarrollo de estrategias de control de diseminación de *Salmonella*, al intervenir a nivel de los organismos en donde reside la bacteria.

8.- CONCLUSIONES

- El efector SseJ de *S. Typhimurium* se produce en respuesta a las señales ambientales que inducen la expresión de la SPI-2 y es secretado *in vitro* a través del T3SS-2.
- El efector SseJ de *S. Typhimurium* es producido cuando la bacteria reside al interior de la ameba *D. discoideum*. Sin embargo, no se logró confirmar experimentalmente la translocación del efector al citoplasma de la ameba durante la infección.
- El efector SseJ contribuye a la internalización de *S. Typhimurium* en *D. discoideum* y es requerido para la supervivencia intracelular de la bacteria en esta ameba.

9.- BIBLIOGRAFÍA

- Albert-Weissenberger, C., Cazalet, C., and Buchrieser, C. (2007). *Legionella pneumophila* - a human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa. *Cell Mol Life Sci* 64(4), 432-448.
- Alpuche-Aranda, C.M., Racoosin, E.L., Swanson, J.A., and Miller, S.I. (1994). *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J Exp Med* 179(2), 601-608.
- Anacarso, I., de Niederhausern, S., Messi, P., Guerrieri, E., Iseppi, R., Sabia, C., et al. (2012). *Acanthamoeba polyphaga*, a potential environmental vector for the transmission of food-borne and opportunistic pathogens. *J Basic Microbiol* 52(3), 261-268.
- Bakowski, M.A., Braun, V., Lam, G.Y., Yeung, T., Heo, W.D., Meyer, T., et al. (2010). The phosphoinositide phosphatase SopB manipulates membrane surface charge and trafficking of the *Salmonella*-containing vacuole. *Cell Host Microbe* 7(6), 453-462.
- Barisch, C., Paschke, P., Hagedorn, M., Maniak, M., and Soldati, T. (2015). Lipid droplet dynamics at early stages of *Mycobacterium marinum* infection in *Dictyostelium*. *Cell Microbiol* 17(9), 1332-1349.
- Barker, J., Humphrey, T.J., and Brown, M.W. (1999). Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease. *FEMS Microbiol Lett* 173(2), 291-295.
- Baumler, A.J. (1997). The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*. *Trends Microbiol* 5(8), 318-322.
- Beuzon, C.R., Meresse, S., Unsworth, K.E., Ruiz-Albert, J., Garvis, S., Waterman, S.R., et al. (2000). *Salmonella* maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of SifA. *EMBO J* 19(13), 3235-3249.
- Birmingham, C.L., Jiang, X., Ohlson, M.B., Miller, S.I., and Brumell, J.H. (2005). *Salmonella*-induced filament formation is a dynamic phenotype induced by rapidly replicating *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in epithelial cells. *Infect Immun* 73(2), 1204-1208.

- Bleasdale, B., Lott, P.J., Jagannathan, A., Stevens, M.P., Birtles, R.J., and Wigley, P. (2009). The *Salmonella* pathogenicity island 2-encoded type III secretion system is essential for the survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in free-living amoebae. *Appl Environ Microbiol* 75(6), 1793-1795.
- Blondel C, Jiménez J, Leiva L, Álvarez S, Pinto B, Contreras F, Pezoa D, Santiviago C, Contreras I. (2013). The type VI secretion system encoded in *Salmonella* pathogenicity island 19 is required for *Salmonella enterica* serotype Gallinarum survival within infected macrophages. *Infect Immun* 81:1207-1220.
- Boucrot, E., Henry, T., Borg, J.P., Gorvel, J.P., and Meresse, S. (2005). The intracellular fate of *Salmonella* depends on the recruitment of kinesin. *Science* 308(5725), 1174-1178.
- Bozzaro, S., and Eichinger, L. (2011). The professional phagocyte *Dictyostelium discoideum* as a model host for bacterial pathogens. *Curr Drug Targets* 12(7), 942-954.
- Brandl, M.T., Rosenthal, B.M., Haxo, A.F., and Berk, S.G. (2005). Enhanced survival of *Salmonella enterica* in vesicles released by a soilborne *Tetrahymena* species. *Appl Environ Microbiol* 71(3), 1562-1569.
- Brawn, L.C., Hayward, R.D., and Koronakis, V. (2007). *Salmonella* SPI1 effector SipA persists after entry and cooperates with a SPI2 effector to regulate phagosome maturation and intracellular replication. *Cell Host Microbe* 1(1), 63-75.
- Brenner, F.W., Villar, R.G., Angulo, F.J., Tauxe, R., and Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* nomenclature - Guest commentary. *Journal of Clinical Microbiology* 38(7), 2465-2467.
- Brumell, J.H., Goosney, D.L., and Finlay, B.B. (2002). SifA, a type III secreted effector of *Salmonella* Typhimurium, directs *Salmonella*-induced filament (Sif) formation along microtubules. *Traffic* 3(6), 407-415.
- Brumell, J.H., Tang, P., Mills, S.D., and Finlay, B.B. (2001). Characterization of *Salmonella*-induced filaments (Sifs) reveals a delayed interaction between *Salmonella*-containing vacuoles and late endocytic compartments. *Traffic* 2(9), 643-653.

- Bueno, S.M., Riquelme, S., Riedel, C.A., and Kalergis, A.M. (2012). Mechanisms used by virulent *Salmonella* to impair dendritic cell function and evade adaptive immunity. *Immunology* 137(1), 28-36.
- Canals, R., McClelland, M., Santiviago, C. A., Andrews-Polymenis, H. (2011). "Genomics of *Salmonella* species" In "Genomics of Foodborne Pathogens". Wei Zhang and Martin Wiedmann (Eds). *Springer New York*, pp 171-235.
- Cardenal-Muñoz, E., Ramos-Morales, F. (2011). Analysis of the Expression, Secretion and Translocation of the *Salmonella enterica* Type III Secretion System Effector SteA. *PLoS ONE* 6(10): e26930
- Cirillo, D.M., Valdivia, R.H., Monack, D.M., and Falkow, S. (1998). Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Molecular Microbiology* 30(1), 175-188.
- Cirillo, J.D., Cirillo, S.L., Yan, L., Bermudez, L.E., Falkow, S., and Tompkins, L.S. (1999). Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 67(9), 4427-4434.
- Coburn, B., Grassl, G.A., and Finlay, B.B. (2007). *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunology and Cell Biology* 85(2), 112-118.
- Cooper, G.L., Nicholas, R.A., Cullen, G.A., Hormaeche, C.E. (1990). Vaccination of chickens with a *Salmonella enteritidis* aroA live oral *Salmonella* vaccine. *Microb. Pathog.* 9, 255-265.
- Christen, M., Coye, L.H., Hontz, J.S., LaRock, D.L., Pfuetzner, R.A., Megha. (2009). Activation of a bacterial virulence protein by the GTPase RhoA. *Sci Signal* 2(95), ra71.
- D'Costa, V.M., Braun, V., Landekic, M., Shi, R., Proteau, A., McDonald, L. (2015). *Salmonella* Disrupts Host Endocytic Trafficking by SopD2-Mediated Inhibition of Rab7. *Cell Reports* 12(9), 1508-1518.
- Datsenko K, Wanner B. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6640-6645.
- de Felipe, K. S., Pampou, S., Jovanovic, O. S., Pericone, C. D., Ye, S. F., Kalachikov, S., Shuman, H. A. (2005) Evidence of Acquisition *Legionella* Type IV Secretion

- Substrates via Interdomain Horizontal Gene Transfer. *J Bacteriol* 187, 7716-7726.
- Desai, P.T., Porwollik, S., Long, F., Cheng, P., Wollam, A., Bhonagiri-Palsikar, V., et al. (2013). Evolutionary Genomics of *Salmonella enterica* Subspecies. *mBio* 4(2).
- Domingues, L., Holden, D.W., and Mota, L.J. (2014). The *Salmonella* effector SteA contributes to the control of membrane dynamics of *Salmonella*-containing vacuoles. *Infect Immun* 82(7), 2923-2934.
- Drecktrah, D., Knodler, L.A., Galbraith, K., and Steele-Mortimer, O. (2005). The *Salmonella* SPI1 effector SopB stimulates nitric oxide production long after invasion. *Cell Microbiol* 7(1), 105-113.
- Drecktrah, D., Levine-Wilkinson, S., Dam, T., Winfree, S., Knodler, L.A., Schroer, T.A., et al. (2008). Dynamic behavior of *Salmonella*-induced membrane tubules in epithelial cells. *Traffic* 9(12), 2117-2129.
- Duhon, D., and Cardelli, J. (2002). The regulation of phagosome maturation in *Dictyostelium*. *J Muscle Res Cell Motil* 23(7-8), 803-808.
- Eichinger, L. (2003). Revamp a model-status and prospects of the *Dictyostelium* genome project. *Curr Genet* 44(2), 59-72.
- Essig, A., Heinemann, M., Simnacher, U., and Marre, R. (1997). Infection of *Acanthamoeba castellanii* by *Chlamydia pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol* 63(4), 1396-1399.
- Feng, Y., Hsiao, Y.H., Chen, H.L., Chu, C., Tang, P., and Chiu, C.H. (2009). Apoptosis-like cell death induced by *Salmonella* in *Acanthamoeba rhysodes*. *Genomics* 94(2), 132-137.
- Fernández, P. A., Zabner, M., Ortega, J., Morgado, C., Amaya, F., Vera, G., Rubilar, C., Salas, B., Cuevas, V., Valenzuela, C., Baisón-Olmo, F., Álvarez, S. A., Santiviago, C. A. (2021). Novel Template Plasmids pCyaA'-Kan and pCyaA'-Cam for Generation of Unmarked Chromosomal *cyaA'* Translational Fusion to T3SS Effectors in *Salmonella*. *Microorganisms*. 2021 Feb 25;9(3):475.
- Figueira, R., and Holden, D.W. (2012). Functions of the *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors. *Microbiology* 158(Pt 5), 1147-1161.
- Figueira, R., Watson, K.G., Holden, D.W., and Helaine, S. (2013). Identification of *Salmonella* pathogenicity island-2 type III secretion system effectors involved in

- intramacrophage replication of *S. enterica* serovar Typhimurium: implications for rational vaccine design. *mBio* 4(2), e00065.
- Frederiksen, R.F., and Leisner, J.J. (2015). Effects of *Listeria monocytogenes* EGD-e and *Salmonella enterica* ser. Typhimurium LT2 chitinases on intracellular survival in *Dictyostelium discoideum* and mammalian cell lines. *FEMS Microbiol Lett* 362(10).
- Freeman, J.A., Ohl, M.E., and Miller, S.I. (2003). The *Salmonella enterica* serovar Typhimurium translocated effectors SseJ and SifB are targeted to the *Salmonella*-containing vacuole. *Infect Immun* 71(1), 418-427.
- Gal-Mor, O., Boyle, E.C., and Grassl, G.A. (2014). Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Front Microbiol* 5, 391.
- Galan, J.E., and Curtiss, R., 3rd (1989). Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella* Typhimurium to penetrate tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(16), 6383-6387.
- Garcia-del Portillo, F., and Finlay, B.B. (1995). Targeting of *Salmonella* Typhimurium to vesicles containing lysosomal membrane glycoproteins bypasses compartments with mannose 6-phosphate receptors. *J Cell Biol* 129(1), 81-97.
- Garcia-del Portillo, F., Nunez-Hernandez, C., Eisman, B., and Ramos-Vivas, J. (2008). Growth control in the *Salmonella*-containing vacuole. *Curr Opin Microbiol* 11(1), 46-52.
- Gaze, W.H., Burroughs, N., Gallagher, M.P., and Wellington, E.M. (2003). Interactions between *Salmonella* Typhimurium and *Acanthamoeba polyphaga*, and observation of a new mode of intracellular growth within contractile vacuoles. *Microb Ecol* 46(3), 358-369.
- Gourabathini, P., Brandl, M.T., Redding, K.S., Gunderson, J.H., and Berk, S.G. (2008). Interactions between food-borne pathogens and protozoa isolated from lettuce and spinach. *Appl Environ Microbiol* 74(8), 2518-2525.
- Greene, A. R., Owen, K. A., Casanova, J. E. (2021). *Salmonella* Typhimurium manipulates macrophage cholesterol homeostasis through the SseJ-mediated suppression of the host cholesterol transport protein ABCA1. *Cell Microbiol* 2021;e13329.

- Groisman, E.A., and Ochman, H. (1997). How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol* 5(9), 343-349.
- Guy, R.L., Gonias, L.A., and Stein, M.A. (2000). Aggregation of host endosomes by *Salmonella* requires SPI2 translocation of SseFG and involves SpvR and the fms-aroE intragenic region. *Mol Microbiol* 37(6), 1417-1435.
- Haraga, A., Ohlson, M.B., and Miller, S.I. (2008). *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol* 6(1), 53-66.
- Harb, O.S., Gao, L.Y., and Abu Kwaik, Y. (2000). From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens. *Environ Microbiol* 2(3), 251-265.
- Hardt, W.D., Chen, L.M., Schuebel, K.E., Bustelo, X.R., and Galan, J.E. (1998). *S. Typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* 93(5), 815-826.
- Henry, T., Couillault, C., Rockenfeller, P., Boucrot, E., Dumont, A., Schroeder, N., et al. (2006). The *Salmonella* effector protein PipB2 is a linker for kinesin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(36), 13497-13502.
- Hensel, M., Shea, J.E., Gleeson, C., Jones, M.D., Dalton, E., and Holden, D.W. (1995). Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* 269(5222), 400-403.
- Hernandez, L.D., Hueffer, K., Wenk, M.R., and Galan, J.E. (2004). *Salmonella* modulates vesicular traffic by altering phosphoinositide metabolism. *Science* 304(5678), 1805-1807.
- Huws, S.A., Morley, R.J., Jones, M.V., Brown, M.R., and Smith, A.W. (2008). Interactions of some common pathogenic bacteria with *Acanthamoeba polyphaga*. *FEMS Microbiol Lett* 282(2), 258-265.
- Jarvik T, Smillie C, Groisman EA, Ochman H. (2010). Short-term signatures of evolutionary change in the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028 genome. *J Bacteriol* 192(2):560-567.
- Jia, K., Thomas, C., Akbar, M., Sun, Q., Adams-Huet, B., Gilpin, C., et al. (2009). Autophagy genes protect against *Salmonella* Typhimurium infection and

- mediate insulin signaling-regulated pathogen resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(34), 14564-14569.
- Jiang, X., Rossanese, O.W., Brown, N.F., Kujat-Choy, S., Galan, J.E., Finlay, B.B., et al. (2004). The related effector proteins SopD and SopD2 from *Salmonella* enterica serovar Typhimurium contribute to virulence during systemic infection of mice. *Mol Microbiol* 54(5), 1186-1198.
- Jones, B.D., Ghori, N., and Falkow, S. (1994). *Salmonella* Typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* 180(1), 15-23.
- Kebbi-Beghdadi, C., and Greub, G. (2014). Importance of amoebae as a tool to isolate amoeba-resisting microorganisms and for their ecology and evolution: the *Chlamydia* paradigm. *Environ Microbiol Rep* 6(4), 309-324.
- Knodler, L.A., and Steele-Mortimer, O. (2003). Taking possession: biogenesis of the *Salmonella*-containing vacuole. *Traffic* 4(9), 587-599.
- Knuff, K., and Finlay, B.B. (2017). What the SIF Is Happening - The Role of Intracellular *Salmonella*-Induced Filaments. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 335.
- Knuff-Janzen, K., Tupin, A., Yurist-Doutsch, S., Rowland, J. L., Finlay, B. B. (2020) Multiple *Salmonella*-pathogenicity island 2 effectors are required to facilitate bacterial establishment of its intracellular niche and virulence. *PLoS ONE* 15(6): e0235020.
- Kolodziejek, A.M., and Miller, S.I. (2015). *Salmonella* modulation of the phagosome membrane, role of SseJ. *Cell Microbiol* 17(3), 333-341.
- Kolodziejek, A.M., Altura, M. A., Fan, J., Petersen, E. M., Cook, M., Brzovic P. S., Miller, S. I. (2019). *Salmonella* Translocated Effectors Recruit OSBP1 to Phagosome to Promote Vacuolar Membrane Integrity. *Cell Reports* 27, 2147-2156.
- Krieger, V., Liebl, D., Zhang, Y., Rajashekar, R., Chlanda, P., Giesker, K., et al. (2014). Reorganization of the endosomal system in *Salmonella*-infected cells: the ultrastructure of *Salmonella*-induced tubular compartments. *PLoS Pathog* 10(9), e1004374.

- Kuhle, V., Abrahams, G.L., and Hensel, M. (2006). Intracellular *Salmonella enterica* redirect exocytic transport processes in a *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent manner. *Traffic* 7(6), 716-730.
- LaRock, D.L., Brzovic, P.S., Levin, I., Blanc, M.P., and Miller, S.I. (2012). A *Salmonella* Typhimurium-translocated glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase promotes virulence by binding to the RhoA protein switch regions. *J Biol Chem* 287(35), 29654-29663.
- LaRock, D.L., Chaudhary, A., and Miller, S.I. (2015). *Salmonellae* interactions with host processes. *Nat Rev Microbiol* 13(4), 191-205.
- Lawley, T.D., Chan, K., Thompson, L.J., Kim, C.C., Govoni, G.R., and Monack, D.M. (2006). Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS Pathog* 2(2), e11.
- Liss, V., Swart, A.L., Kehl, A., Hermanns, N., Zhang, Y., Chikkaballi, D., et al. (2017). *Salmonella enterica* Remodels the Host Cell Endosomal System for Efficient Intravacuolar Nutrition. *Cell Host Microbe* 21(3), 390-402.
- Lorenzo-Morales, J., Martinez-Carretero, E., Batista, N., Alvarez-Marin, J., Bahaya, Y., Walochnik, J., et al. (2007). Early diagnosis of amoebic keratitis due to a mixed infection with *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. *Parasitol Res* 102(1), 167-169.
- Lossi, N.S., Rolhion, N., Magee, A.I., Boyle, C., and Holden, D.W. (2008). The *Salmonella* SPI-2 effector SseJ exhibits eukaryotic activator-dependent phospholipase A and glycerophospholipid : cholesterol acyltransferase activity. *Microbiology* 154(Pt 9), 2680-2688.
- Ly, T.M., and Muller, H.E. (1990). Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa. *J Med Microbiol* 33(1), 51-54.
- Marcus, S.L., Brumell, J.H., Pfeifer, C.G., and Finlay, B.B. (2000). *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect* 2(2), 145-156.
- Marolda, C.L., Hauröder, B., John, M.A., Michel, R., and Valvano, M.A. (1999). Intracellular survival and saprophytic growth of isolates from the *Burkholderia cepacia* complex in free-living amoebae. *Microbiology* 145 (Pt 7), 1509-1517.
- Matteoni, R., and Kreis, T.E. (1987). Translocation and clustering of endosomes and lysosomes depends on microtubules. *J Cell Biol* 105(3), 1253-1265.

- Mella, C., Medina, G., Flores-Martin, S., Toledo, Z., Simaluiza, R. J., Perez-Perez, G., Fernandez, H. (2016). Interaction between zoonotic bacteria and free living amoebas. A new angle of an epidemiological polyhedron of public health importance? *Arch. Med. Vet.*, 48, 1-10.
- Meresse, S., Steele-Mortimer, O., Finlay, B.B., and Gorvel, J.P. (1999). The rab7 GTPase controls the maturation of *Salmonella* Typhimurium-containing vacuoles in HeLa cells. *EMBO J* 18(16), 4394-4403.
- Miao, E.A., and Miller, S.I. (2000). A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by *Salmonella* Typhimurium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(13), 7539-7544.
- Monack, D.M., Bouley, D.M., and Falkow, S. (2004). *Salmonella* Typhimurium persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected Nrpmp1^{+/+} mice and can be reactivated by IFN γ neutralization. *J Exp Med* 199(2), 231-241.
- Nawabi, P., Catron, D.M., and Haldar, K. (2008). Esterification of cholesterol by a type III secretion effector during intracellular *Salmonella* infection. *Mol Microbiol* 68(1), 173-185.
- Niemann, G. S., Brown, R. N., Gustin, J. K., Stufkens, A., Afshan, S., Li, J., McDermott, J. E., Brewer, H. M., Schepmoes, A., Smith, R. D., Adkins, J. N., Heffron, F. (2011). Discovery of Novel Secreted Virulence Factors from *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium by Proteomic Analysis of Culture Supernatants. *Infect Immun* 73:6260-6271.
- Ohlson, M.B., Fluhr, K., Birmingham, C.L., Brumell, J.H., and Miller, S.I. (2005). SseJ deacylase activity by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium promotes virulence in mice. *Infect Immun* 73(10), 6249-6259.
- Ohlson, M.B., Huang, Z., Alto, N.M., Blanc, M.P., Dixon, J.E., Chai, J., et al. (2008). Structure and function of *Salmonella* SifA indicate that its interactions with SKIP, SseJ, and RhoA family GTPases induce endosomal tubulation. *Cell Host Microbe* 4(5), 434-446.
- Patel, J.C., and Galan, J.E. (2006). Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. *J Cell Biol* 175(3), 453-463.

- Perrett, C.A., and Zhou, D. (2013). *Salmonella* type III effector SopB modulates host cell exocytosis. *Emerg Microbes Infect* 2(5), e32.
- Raines, S.A., Hodgkinson, M.R., Dowle, A.A., and Pryor, P.R. (2017). The *Salmonella* effector SseJ disrupts microtubule dynamics when ectopically expressed in normal rat kidney cells. *PLoS One* 12(2), e0172588.
- Rajashekar, R., Liebl, D., Seitz, A., and Hensel, M. (2008). Dynamic remodeling of the endosomal system during formation of *Salmonella*-induced filaments by intracellular *Salmonella enterica*. *Traffic* 9(12), 2100-2116.
- Ramos-Morales F. (2012). Impact of *Salmonella enterica* type III secretion system effectors on the eukaryotic host cell. *ISRN Cell Biology* 2012:787934.
- Reh fuss, M.Y., Parker, C.T., and Brandl, M.T. (2011). *Salmonella* transcriptional signature in *Tetrahymena* phagosomes and role of acid tolerance in passage through the protist. *ISME J* 5(2), 262-273.
- Riquelme, S., Varas, M., Valenzuela, C., Velozo, P., Chahin, N., Aguilera, P., et al. (2016). Relevant Genes Linked to Virulence Are Required for *Salmonella* Typhimurium to Survive Intracellularly in the Social Amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Front Microbiol* 7, 1305.
- Rowbotham, T.J. (1980). Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* 33(12), 1179-1183.
- Ruiz-Albert, J., Yu, X.J., Beuzon, C.R., Blakey, A.N., Galyov, E.E., and Holden, D.W. (2002). Complementary activities of SseJ and SifA regulate dynamics of the *Salmonella* Typhimurium vacuolar membrane. *Mol Microbiol* 44(3), 645-661.
- Santiviago C, Reynolds M, Porwollik S, Choi S, Long F, Andrews-Polymenis H, McClelland M. (2009). Analysis of pools of targeted *Salmonella* deletion mutants identifies novel genes affecting fitness during competitive infection in mice. *PLoS Pathog* 5:e1000477.
- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Widdowson, M.A., Hall, A.J., and Griffin, P.M. (2011). Foodborne Illness Acquired in the United States Response. *Emerging Infectious Diseases* 17(7), 1339-1340.
- Schroeder, N., Henry, T., de Chastellier, C., Zhao, W., Guilhon, A.A., Gorvel, J.P., et al. (2010). The virulence protein SopD2 regulates membrane dynamics of *Salmonella*-containing vacuoles. *PLoS Pathog* 6(7), e1001002.

- Segal, G., and Shuman, H.A. (1999). *Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages. *Infect Immun* 67(5), 2117-2124.
- Sillo, A., Matthias, J., Konertz, R., Bozzaro, S., and Eichinger, L. (2011). *Salmonella* Typhimurium is pathogenic for *Dictyostelium* cells and subverts the starvation response. *Cell Microbiol* 13(11), 1793-1811.
- Skriwan, C., Fajardo, M., Hagele, S., Horn, M., Wagner, M., Michel, R., et al. (2002). Various bacterial pathogens and symbionts infect the amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Int J Med Microbiol* 291(8), 615-624.
- Smith, A.C., Cirulis, J.T., Casanova, J.E., Scidmore, M.A., and Brumell, J.H. (2005). Interaction of the *Salmonella*-containing vacuole with the endocytic recycling system. *J Biol Chem* 280(26), 24634-24641.
- Sory, M. P., Boland, A., Lambermont, I., Cornelis, G. R. (1995). Identification of the YopE and YopH domains required for the secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92, 11998-12002.
- Steele-Mortimer, O., Meresse, S., Gorvel, J.P., Toh, B.H., and Finlay, B.B. (1999). Biogenesis of *Salmonella* Typhimurium-containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway. *Cell Microbiol* 1(1), 33-49.
- Stein, M.A., Leung, K.Y., Zwick, M., Garcia-del Portillo, F., and Finlay, B.B. (1996). Identification of a *Salmonella* virulence gene required for formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins within epithelial cells. *Mol Microbiol* 20(1), 151-164.
- Steinert, M. (2011). Pathogen-host interactions in *Dictyostelium*, *Legionella*, *Mycobacterium* and other pathogens. *Semin Cell Dev Biol* 22(1), 70-76.
- Tezcan-Merdol, D., Ljungstrom, M., Winiiecka-Krusnell, J., Linder, E., Engstrand, L., and Rhen, M. (2004). Uptake and replication of *Salmonella enterica* in *Acanthamoeba rhyodes*. *Appl Environ Microbiol* 70(6), 3706-3714.
- Thomas, V., and Greub, G. (2010). Amoeba/amoebal symbiont genetic transfers: lessons from giant virus neighbours. *Intervirology* 53(5), 254-267.

- Urrutia Í. M., Sabag A., Valenzuela C., Labra B., Álvarez S. A., Santiviago C. A. (2018) Contribution of the Twin-Arginine Translocation System to the Intracellular Survival of *Salmonella* Typhimurium in *Dictyostelium discoideum*. *Front Microbiol* 9:3001.
- Uzzau S, Figueroa-Bossi N, Rubino S, Bossi L. (2001). Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:15264-15269.
- van der Heijden, J., and Finlay, B.B. (2012). Type III effector-mediated processes in *Salmonella* infection. *Future Microbiology* 7(6), 685-703.
- Valenzuela, C., Gil, M., Urrutia, Í.M., Sabag, A., Enninga, J., Santiviago C.A. (2020). SopB- and SifA-dependent shaping of the *Salmonella* containing vacuole proteome in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Cell Microbiol* 2021;23:e13263.
- Waterman, S.R., and Holden, D.W. (2003). Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell Microbiol* 5(8), 501-511.
- Wildschutte, H., and Lawrence, J.G. (2007). Differential *Salmonella* survival against communities of intestinal amoebae. *Microbiology* 153(Pt 6), 1781-1789.
- Wildschutte, H., Wolfe, D.M., Tamewitz, A., and Lawrence, J.G. (2004). Protozoan predation, diversifying selection, and the evolution of antigenic diversity in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(29), 10644-10649.
- Worley, M.J., Niemann, G.S., Geddes, K., and Heffron, F. (2006). *Salmonella* Typhimurium disseminates within its host by manipulating the motility of infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(47), 17915-17920.
- Yu, J., Grzegorz, G. J., Liu, M., Mota, L. J., Holden, D. W. (2018). SsaV interacts with SsaL to Control the Translocon-to-Effector Switch in the *Salmonella* SPI-2 Type Three Secretion System. *mBio* 9:e01149-18.
- Yu, J., McGourty, K., Liu, M., Unsworth, K. E., Holden, D. W. (2010). pH Sensing by Intracellular *Salmonella* Induces Effector Translocation. *Science* 80:2940-2947.
- Zhou, X., Ritchie J., Hiyoshi, H., Iida, T., Davis, B., Waldor, M., Kodama, T. (2012). The hydrophilic translocator for *Vibrio parahaemolyticus*, T3SS2, is also translocated. *Infect Immun* 80:2940-2947.