



Contribución del efector SopB a la maduración de la Vacuola Contenedora de *Salmonella* en *Dictyostelium discoideum* y su rol en el remodelamiento de la vía endocítica del hospedero

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:

MARCELA ESTEFANÍA ZABNER ESPINOZA

**Directores de Tesis
Dr. Carlos A. Santiviago
Dr. Sergio A. Álvarez**

**Laboratorio de Microbiología,
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas,
Universidad de Chile**

**Santiago - CHILE
2022**

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER

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

MARCELA ESTEFANÍA ZABNER ESPINOZA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de especialización en Bioquímica Toxicológica y Diagnóstico Molecular y al título de Bioquímica, en el examen público rendido el día _____.

Directores de Tesis:

Dr. Carlos A. Santiviago _____

Dr. Sergio A. Álvarez _____

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Davor Cotoras (Presidente) _____

Dra. Valentina Parra _____

Dr. Carlos Blondel _____

*“No cualquiera puede convertirse en un gran artista,
pero un gran artista puede provenir de cualquier lado”*

-Ratatouille

AGRADECIMIENTOS

Desde el fondo de mi corazón, le agradezco a todos y cada uno de los que hicieron esto posible. A mi familia. Mi mamá Ana, mi papá Marcelo, a mis hermanas Carola, Romy y Maureen, que me dieron su apoyo incondicional a lo largo de estos años, dándome la libertad de elegir y haciendo todos los esfuerzos posibles velando por mi bienestar. A mi abuelita Eliana, que me cuida desde donde esté. A mi abuelita Esther, por inspirarme. A mis tíos, Raquel y Horacio, que a pesar de la distancia siempre se hicieron presente. A León Pol del Tránsito, por supuesto, por ser el más pesadilla y ser mi almohada en mis colapsos emocionales.

Les agradezco a mis tutores de tesis, Cliff y Sergio, ¡por ser los mejores tutores de la vida! Por su apoyo, su cariño, sus consejos y por amar la microbiología y la ciencia tanto como yo lo hago. Por supuesto agradezco a mi Comisión, al Dr. Davor Cotoras, al Dr. Carlos Blondel y a la Dra. Valentina Parra. Gracias por todos sus consejos para potenciar mi desarrollo profesional. En especial Profe Vale, gracias por ser un ejemplo para las mujeres en la ciencia.

Quisiera agradecer a mis compañeros de Laboratorio. A Chinchi, por ser mi Sagitariana favorita en todo el mundo, por contagiarme su risa y por su apoyo incondicional. A Feña, por ser el mejor compañero, siempre dispuesto a ayudar. A Morgan, por ser mi mamá del laboratorio. A Cometa, gracias por compartir tantas risas conmigo y tantas copuchas. A Kamo, que a pesar de la distancia siempre lo dio todo, me ayudó tantas veces a comprender cosas y salvó mi vida y mi tesis en más de una ocasión. A Andrea, por su amistad y cariño. A Pali, por su sabiduría infinita y ser la mejor tutora de Unidad. A Hector, por ser el mejor gato arrabalero. A Caro, por ser la niña de unidad más bacán. A Lindo, todo es posible gracias a usted! A Bea, Ítalo, Negro, todo mi lab ¡son lo máximo Labmicro!

Además, agradezco a todo mi equipo en PhageLab, por darme ánimo, acompañarme y darme todas las facilidades durante este proceso. Por sus felicitaciones, por su cariño. En especial a Pabla y a Dani, ¿y ahora qué?

Agradezco a todos mis amigos que han sido parte de este camino. A Uchi, por estar desde el día 1, siendo la mejor partner de laboratorio. Por estar siempre juntas. También a mis amiguitos coreanos, Nico, Xuxi, Pambi, Fran, Dani, Chuchu, Valen. Los adoro.

Te agradezco, Jimmy, por estar siempre a mi lado. Por cada consejo, tanto académico como de la vida. Por tanto amor.

Gracias a todos por estar conmigo durante este proceso, ¡por ayudarme a crecer y a completar esta etapa con éxito!

Miau

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 del Dr. Carlos A. Santiviago y el Dr. Sergio A. Álvarez. El trabajo fue financiado por los proyectos FONDECYT 1171844 y 1212075, dirigidos por el Dr. Carlos A. Santiviago.

PUBLICACIONES

Paulina Fernández, **Marcela Zabner**, Jaime Ortega, Constanza Morgado, Fernando Amaya, Gabriel Vera, Carolina Rubilar, Beatriz Salas, Víctor Cuevas, Camila Valenzuela, Fernando Baisón-Olmo, Sergio A. Álvarez and Carlos A. Santiviago. (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.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS INTERNACIONALES

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

PRESENTACIONES EN CONGRESOS NACIONALES

Marcela Zabner, Constanza Morgado, Jaime Ortega, Fernando Amaya, Camila Valenzuela, Sergio A. Álvarez, Carlos A. Santiviago. “Contribución de la proteína efectora SopB de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en el remodelamiento de la vía endocítica en *Dictyostelium discoideum*”. XLIII Congreso Chileno de Microbiología, 30 de Noviembre al 2 de Diciembre, 2020, Santiago, Chile.

Fernando Baisón-Olmo, Fernando Amaya, **Marcela Zabner**, Sergio A. Álvarez, Carlos A. Santiviago. “Escrutinio de doble híbrido en levadura para identificar posibles interacciones de los efectores SifA y SopB de *Salmonella* Typhimurium con proteínas de *Dictyostelium discoideum*”. XLIII Congreso Chileno de Microbiología, 30 de Noviembre al 2 de Diciembre, 2021, Santiago, Chile.

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 2020, 2 al 4 de Diciembre, 2020, Santiago, Chile.

Marcela Zabner, Paulina A Fernández, Constanza Morgado, Jaime Ortega, Gabriel Vera, Victor 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.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	IX
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	XI
ABREVIATURAS	XIII
RESUMEN	XV
ABSTRACT	XVIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades de <i>Salmonella</i>	1
1.2 Mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia: los sistemas de secreción de tipo III y sus efectores	2
1.3 Biogénesis de la Vacuola Contenedora de <i>Salmonella</i>	3
1.4 Participación del efector SopB en la biogénesis de la SCV	5
1.5 Interacción entre <i>Salmonella</i> y protozoos	7
1.6 <i>Dictyostelium discoideum</i> como un organismo modelo para estudiar la interacción de <i>Salmonella</i> con protozoos	9
2. HIPÓTESIS	13
3. OBJETIVO GENERAL	13
4. OBJETIVO ESPECÍFICOS	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS	14
5.1 Reactivos	14
5.2 Condiciones de cultivo bacteriano	15
5.3 Transformación de <i>S. Typhimurium</i> con DNA plasmidial para la obtención de mutantes	16
5.4 Plasmidios	18
5.5 Electroforesis en gel de agarosa	19
5.6 Condiciones de cultivo de <i>D. discoideum</i>	19
5.7 Transformación de <i>D. discoideum</i> con DNA plasmidial	20

5.8 Ensayo de infección para determinar la colocalización de <i>S. Typhimurium</i> y los lisosomas de <i>D. discoideum</i> mediante microscopía confocal	23
5.9 Ensayo de infección para determinar la distribución de los fosfoinosítidos PI(3)P y PI(4,5)P2 en la SCV de <i>D. discoideum</i> mediante microscopía confocal	25
5.10 Análisis estadísticos.....	27
6. RESULTADOS	28
6.1 Determinar si el efector SopB participa en evitar la fusión de la SCV con los lisosomas de <i>D. discoideum</i>	28
6.2 Determinar si el efector SopB participa en alterar la composición lipídica de la SCV en <i>D. discoideum</i>	33
7. DISCUSIÓN	43
7.1 Participación de SopB en la evasión de la ruta de degradación lisosomal en <i>D. discoideum</i>	43
7.2 Participación del efector SopB en la composición lipídica de la SCV en <i>D. discoideum</i>	45
8. CONCLUSIONES	52
9. BIBLIOGRAFÍA	53

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1.	Cepas bacterianas utilizadas en esta tesis	16
Tabla 2.	Programa de amplificación para PCR de colonias utilizando partidores <i>sopB_Out3-sopB_Out5</i> y <i>sopB_Out3-K2</i>	17
Tabla 3.	Mezcla de reacción para PCR de colonias utilizando partidores <i>sopB_Out3-sopB_Out5</i> y <i>sopB_Out3-K2</i>	17
Tabla 4.	Oligonucleótidos utilizados en esta tesis.....	18
Tabla 5.	Plasmidios utilizados en esta tesis.....	19
Tabla 6.	Cepas de <i>D. discoideum</i> utilizadas en esta tesis	20

FIGURAS

Figura 1.	Biogénesis de la Vacuola Contenedora de <i>Salmonella</i>	4
Figura 2.	<i>S. Typhimurium</i> reside en un compartimento vacuolar rodeado por la ATPasa vacuolar <i>VatM</i> en <i>D. discoideum</i>	10
Figura 3.	<i>SopB</i> contribuye a la supervivencia intracelular de <i>S. Typhimurium</i> en <i>D. discoideum</i>	11
Figura 4.	Transformación de <i>D. discoideum</i> con DNA plasmidial	22
Figura 5.	Ensayo de infección para determinar la colocalización de <i>S. Typhimurium</i> con los lisosomas de <i>D. discoideum</i> mediante microscopía confocal	24
Figura 6.	Ensayo de infección para determinar la distribución de los fosfoinosítidos <i>PI(3)P</i> y <i>PI(4,5)P2</i> en la SCV de <i>D. discoideum</i> mediante microscopía confocal.....	26
Figura 7.	Confirmación del genotipo de la mutante Δ <i>sopB</i> derivada de <i>S. Typhimurium</i> 14028s	29
Figura 8.	Estandarización de ensayo con <i>Lysotracker Green</i> en <i>D. discoideum</i>	30
Figura 9.	El efector <i>SopB</i> contribuye a evitar la colocalización de <i>S. Typhimurium</i> con estructuras lisosomales de <i>D. discoideum</i> a 0,5 y 1 hpi.....	32
Figura 10.	<i>D. discoideum</i> expresa las sondas fluorescentes asociadas a GFP para detectar <i>PI(3)P</i> y <i>PI(4,5)P2</i>	34

Figura 11. Las sondas 2xFYVE-GFP y PH-PLC δ 1-GFP se asocian a distintas estructuras membranosas en <i>D. discoideum</i>	35
Figura 12. El efector SopB participa en la distribución del PI(3)P hacia la SCV en <i>D. discoideum</i> a 0,5 hpi	36
Figura 13. El PI(4,5)P2 cambia su distribución frente a la infección con <i>S. Typhimurium</i> en <i>D. discoideum</i>	39
Figura 14. El efector SopB no contribuye a modificar la distribución del PI(4,5)P2 en la SCV de <i>D. discoideum</i> a 0,5 y 1 hpi.....	41
Figura 15. Modelo de la modificación de la vía endocítica en <i>D. discoideum</i> frente a la infección con <i>S. Typhimurium</i> y su comparación con células de mamíferos	51

ABREVIATURAS

°C	:	Grados Celsius
μL	:	Microlitros
μM	:	Micromolar
Amp	:	Ampicilina
Amp ^R	:	Resistencia a ampicilina
g	:	Gramos
GFP	:	Proteína fluorescente verde
G418	:	Geneticina
G418 ^R	:	Resistencia a geneticina
h	:	Horas
Kan	:	Kanamicina
Kan ^R	:	Resistencia a kanamicina
kb	:	Kilobases
kV	:	Kilovolts
LB	:	Medio Luria-Bertani
M	:	Molar
mg	:	Miligramos
min	:	Minutos
mL	:	Mililitros
mM	:	Milimolar
MOI	:	Multiplicidad de infección
OD _{600nm}	:	Densidad óptica medida a 600 nanómetros
O/N	:	<i>Overnight</i>
PI	:	Fosfatidilinositol
PI(3)P	:	Fosfatidilinositol 3 fosfato
PI(4,5)P2	:	Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato

bp	:	Pares de bases
PCR	:	Reacción en cadena de la polimerasa
p/v	:	Peso/volumen
s	:	Segundos
SCV	:	Vacuola Contenedora de <i>Salmonella</i>
SEM	:	Error estándar del promedio
SPI	:	Isla de Patogenicidad de <i>Salmonella</i>
Str	:	Estreptomicina
T3SS	:	Sistema de secreción de tipo III
TAE	:	Tris-acetato-EDTA
UFC	:	Unidades formadoras de colonias
V	:	Volts
v/v	:	Volumen/volumen
× g	:	Aceleración gravitacional

RESUMEN

Salmonella es un género de bacterias Gram negativo que incluye más de 2500 serovares, los cuales se distinguen por los antígenos presentes en su superficie. Los serovares de *S. enterica* subespecie *enterica* son causantes de aproximadamente el 99% de los casos de salmonelosis a nivel mundial. El cuadro clínico asociados corresponde a una infección asintomática o un cuadro diarreico. *S. Typhimurium* es un serovar generalista que infecta animales de sangre caliente, incluyendo a los humanos, causándoles principalmente gastroenteritis.

Los principales mecanismos de patogenicidad de *Salmonella* corresponden a los sistemas de secreción de tipo III (T3SS) codificados en las islas de patogenicidad SPI-1 y SPI-2, y las proteínas efectoras secretadas por ellos. Estas últimas participan en las distintas fases de la infección, incluyendo la maduración de la Vacuola Contenedora de *Salmonella* (SCV), compartimento membranoso que permite la replicación intracelular de la bacteria en las células del hospedero. La principal función de algunas proteínas efectoras se asocia a la biogénesis y maduración de la SCV, evitando su fusión con los lisosomas.

Salmonella pasa la mayor parte de su ciclo de vida en el ambiente. Allí puede interactuar con distintos organismos depredadores, como los protozoos, pudiendo residir en su interior. Recientemente, nuestro grupo describió que *S. Typhimurium* es capaz de sobrevivir al interior de la ameba social *Dictyostelium discoideum*. Para ello, utiliza los T3SS codificados en las islas de patogenicidad SPI-1 y SPI-2 y muchos de sus efectores. Entre ellos, se ha demostrado que SopB contribuye a la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*. Este efector es secretado por el T3SS codificado en la isla SPI-1 y posee actividad fosfatidil inositol fosfatasa, que permite modificar la distribución del fosfoinositido PI(4,5)P₂ en células de mamífero. Además, en este mismo modelo se ha demostrado que recluta PI(3) quinasas que aumentan este tipo de fosfoinositidos en la SCV. Esto, entre otras acciones, contribuye a evitar la fusión de la SCV con los lisosomas de la célula hospedera.

En esta tesis se buscó determinar si el efector SopB contribuye a inhibir la fusión de la SCV con los lisosomas de *D. discoideum* mediante ensayos de infección *in vitro* analizados mediante microscopía confocal. Además, se buscó determinar si SopB participa en alterar la distribución de lípidos hacia la SCV monitoreando esta estructura vacuolar a través de estudios de microscopía confocal. Para esto, se transformó la cepa silvestre y una mutante $\Delta sopB$ de *S. Typhimurium* con el plasmidio pFCcGi, que permite la expresión constitutiva de la proteína fluorescente mCherry. Para estudiar si las bacterias intracelulares colocalizan con lisosomas, se infectaron amebas con las cepas mencionadas en presencia del marcador lisosomal *Lysotracker Green*. Los resultados muestran que la mutante $\Delta sopB$ presenta una mayor proporción de bacterias que colocalizan con lisosomas de la ameba, en comparación con la cepa silvestre, tanto a 0,5 y a 1 horas post infección (hpi). Esto sugiere que SopB participa en evitar la degradación de esta bacteria por la vía lisosomal en *D. discoideum*.

Para el estudio de la distribución de fosfoinosítidos, se debió obtener cepas transformantes de *D. discoideum* que contienen plasmidios para la expresión de sondas fluorescentes que reconocen los fosfoinosítidos PI(3)P o PI(4,5)P₂. La transformación de esta ameba con DNA plasmidial se estandarizó durante el desarrollo de esta tesis, definiendo parámetros como la cantidad de DNA plasmidial a utilizar, el voltaje y la capacitancia. Las cepas transformantes se observaron mediante microscopía de epifluorescencia y se confirmó que emitían fluorescencia asociada a la expresión de estas sondas. Con estas cepas se procedió al estudio de la dinámica de fosfoinosítidos. Para el caso de la cepa silvestre, se observó un nivel mayor de bacterias que se encontraban al interior de vacuolas PI(3)P⁺ a 0,5 hpi con respecto a la mutante $\Delta sopB$. Esto sugiere que SopB genera un aumento de PI(3)P en la SCV a tiempos tempranos de infección. Sumado a esto, se evaluó si PI(4,5)P₂ era retenido en la membrana que rodea a *S. Typhimurium* en *D. discoideum*, capturándose imágenes a tiempos muy cortos de infección (10, 20 y 30 s), y además a 0,5 y 1 hpi. Al momento de la internalización, *S. Typhimurium* retiene el fosfoinosítido PI(4,5)P₂ durante los primeros segundos en la membrana que la rodea, perdiéndose posteriormente. De esta forma, esta tesis permitió

confirmar que *S. Typhimurium* modifica la distribución de PI(4,5)P2 durante la infección en *D. discoideum*. Por último, en este mismo modelo dicho fosfoinosítido no fue retenido en la SCV a 0,5 y 1 hpi, tanto en el caso de la cepa silvestre como de la mutante $\Delta sopB$, sugiriendo que SopB no está involucrado en la distribución de PI(4,5)P2 de forma posterior a los primeros segundos de la infección. Estos resultados contribuyen a entender de mejor manera los mecanismos mediante los cuales *S. Typhimurium* puede infectar fagocitos profesionales como *D. discoideum* y sobrevivir en el medio ambiente, contribuyendo al posible desarrollo de nuevas estrategias para controlar las infecciones causadas mundialmente por este patógeno.

ABSTRACT

“Contribution of effector protein SopB to the maturation of the *Salmonella*-containing vacuole and its role in remodeling the endocytic pathway of the host”

Salmonella is a genus of Gram-negative bacteria that includes more than 2500 serovars, which are distinguished by the antigens present on their surface. The serovars of *S. enterica* subspecies *enterica* are responsible for approximately 99% of cases of salmonellosis worldwide. The associated clinical picture corresponds to an asymptomatic infection or diarrhea. *S. Typhimurium* is a generalist serovar that infects warm-blooded animals, including humans, causing mainly gastroenteritis.

The main mechanisms of pathogenicity of *Salmonella* correspond to the type III secretion systems (T3SS) encoded in the pathogenicity islands SPI-1 and SPI-2, and the effector proteins secreted by them. The latter are involved in the different phases of infection, including maturation of the *Salmonella*-containing vacuole (SCV), a membranous compartment that allows intracellular replication of the bacterium in host cells. The main function of some effector proteins is associated with the biogenesis and maturation of the SCV, preventing its fusion with lysosomes.

Salmonella spends most of its life cycle in the environment. There it can interact with different predatory organisms, such as protozoa, being able to reside inside them. Recently, our group described that *S. Typhimurium* is able to survive inside the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. For this purpose, it utilizes the T3SS encoded in the pathogenicity islands SPI-1 and SPI-2 and many of their effectors. Among them, SopB has been shown to contribute to the intracellular survival of *S. Typhimurium* in *D. discoideum*. This effector is secreted by the T3SS encoded in the SPI-1 island and possesses phosphatidylinositol phosphatase activity, which allows modification of the distribution of the phosphoinositide PI(4,5)P₂ in mammalian cells. Furthermore, in this same model it has been shown that it recruits PI(3) kinases that increase this type of phosphoinositides in the SCV. This, among other actions, contributes to prevent SCV fusion with host cell lysosomes.

In this thesis, we sought to determine whether the SopB effector contributes to inhibit SCV fusion with *D. discoideum* lysosomes by in vitro infection assays analyzed by confocal microscopy. In addition, we sought to determine whether SopB participates in altering lipid distribution to the SCV by monitoring this vacuolar structure through confocal microscopy studies. For this, wild-type and a $\Delta sopB$ mutant strain of *S. Typhimurium* were transformed with the plasmid pFCcGi, which allows constitutive expression of the fluorescent protein mCherry. To study whether intracellular bacteria colocalize with lysosomes, amoebae were infected with the above strains in the presence of the lysosomal marker LysoTracker Green. The results show that the $\Delta sopB$ mutant exhibits a higher proportion of bacteria that colocalize with amoeba lysosomes compared to the wild-type strain at both 0,5 and 1 h post infection (hpi). This suggests that SopB is involved in preventing degradation of this bacterium by the lysosomal pathway in *D. discoideum*.

To study the distribution of phosphoinositides, transformant strains of *D. discoideum* containing plasmids that encode fluorescent probes recognizing PI(3)P or PI(4,5)P₂ phosphoinositides had to be obtained. The transformation of this amoeba with plasmid DNA was standardized during the development of this thesis, defining parameters such as the amount of plasmid DNA to be used, voltage and capacitance. The transformant strains were observed by epifluorescence microscopy to confirm the emission of fluorescence associated with the expression of these probes. These strains were used to study the phosphoinositide dynamics. In the case of the wild-type strain, a higher level of bacteria inside PI(3)P⁺ vacuoles was observed at 0.5 hpi compared to the $\Delta sopB$ mutant. This suggests that SopB generates an increase of PI(3)P in the SCV at early times of infection. In addition, we evaluated whether PI(4,5)P₂ was retained in the membrane surrounding *S. Typhimurium* in *D. discoideum*, capturing images at very short times of infection (10, 20 and 30 s), and also at 0.5 and 1 hpi. Upon internalization, *S. Typhimurium* retains the phosphoinositide PI(4,5)P₂ during the first few seconds in the surrounding membrane and is subsequently lost. Thus, we confirmed that *S. Typhimurium* modifies the distribution of PI(4,5)P₂ during infection in *D. discoideum*. Finally, in this model the phosphoinositide was not retained in the SCV at 0.5 and 1 hpi, both in the

case of the wild-type and the $\Delta sopB$ mutant strains, suggesting that SopB is not involved in the distribution of PI(4,5)P₂ after the first seconds of infection. These results contribute to a better understanding of the mechanisms by which *S. Typhimurium* can infect professional phagocytes such as *D. discoideum* and survive in the environment, contributing to the possible development of new strategies to control infections caused worldwide by this pathogen.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de *Salmonella*

Salmonella corresponde a un género de bacterias Gram negativo compuesto por dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica* (Brenner et al., 2000). Esta última especie se divide en 6 subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Por otra parte, el género *Salmonella* incluye más de 2500 serovares que pueden ser diferenciados según variaciones del antígeno O del lipopolisacárido y del flagelo (antígeno H) (Popoff, 2001; Popoff et al., 2004). Los serovares de *S. enterica* subespecie *enterica* son causantes de aproximadamente el 99% de los casos de salmonelosis en animales de sangre caliente a nivel mundial. La severidad del cuadro clínico causado depende del serovar causante de la infección. Los síntomas pueden abarcar desde una infección asintomática o un cuadro diarreico leve hasta una enfermedad sistémica grave que puede derivar en la muerte del individuo, como la fiebre tifoidea. Según la capacidad de cada serovar para infectar distintos organismos podemos clasificarlos en “generalistas” (como *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*), los cuales tienen un amplio rango de hospederos, o “especialistas” (como *S. Typhi* y *S. Gallinarum*), los cuales tienen un rango de hospedero más acotado o incluso un hospedero único (Feasey et al., 2012). *S. Typhimurium* es un serovar generalista que infecta animales de sangre caliente, incluyendo a los humanos. En ellos genera un cuadro conocido como gastroenteritis, el cual se caracteriza por diarrea, vómito y náuseas. La infección suele ser autolimitada en individuos inmunocompetentes (Raffatellu et al., 2006).

En términos generales, el ciclo infeccioso de *Salmonella* comienza con el ingreso al hospedero por vía fecal-oral, usualmente a través de agua o alimentos contaminados. Una vez que ingresa al sistema digestivo, la bacteria sobrevive al pH ácido estomacal y coloniza el tracto intestinal. Allí, invade el epitelio del intestino delgado por la cara apical pasando al subepitelio, donde es capturada por células fagocíticas (como macrófagos y células dendríticas residentes) a las cuales utiliza como vehículo para su diseminación por el organismo. En dichas células, la bacteria

se encuentra contenida dentro de una vesícula especializada que evita su fusión con el lisosoma, estableciendo un nicho en el cual puede sobrevivir y replicarse (Cirillo et al., 1998; Hensel et al., 1997; Rappl et al., 2003; Waterman & Holden, 2003). En el caso de la enterocolitis, se desarrolla una respuesta inflamatoria local en el intestino causada principalmente por la infiltración de linfocitos polimorfonucleares y la producción y secreción de citoquinas proinflamatorias, lo cual genera una inflamación de la mucosa intestinal (Coburn et al., 2007; Haraga et al., 2008).

1.2 Mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia: los sistemas de secreción de tipo III y sus efectores

A partir de estudios realizados usando a *S. Typhimurium* como organismo modelo, se han descrito numerosos mecanismos de patogenicidad de *Salmonella* en su interacción con sus diversos hospederos (Galán & Curtiss, 1989; Galán et al., 1992; Gulig & Doyle, 1993; Hensel et al., 1995). Gracias a dichos estudios se identificaron regiones de gran tamaño localizados en el cromosoma bacteriano, conocidos como “Islas de Patogenicidad de *Salmonella*” (SPI). Dentro de estas regiones se encuentran codificados múltiples factores de virulencia de *Salmonella*, la mayoría de ellos localizados en 5 islas de patogenicidad (SPI-1 a SPI-5) que son conservadas en los serovares de *S. enterica* (Desai et al., 2013). Otros estudios han destacado la importancia del plasmidio de virulencia de *Salmonella* en el proceso de infección (Gulig & Doyle, 1993). Entre los principales factores de virulencia de *Salmonella* se encuentran los “sistemas de secreción de tipo III” (T3SS) (Hume et al., 2017) codificados en las islas de patogenicidad SPI-1 y SPI-2. Estos sistemas translocan proteínas de virulencia llamadas “efectores” desde el citoplasma bacteriano al de una célula eucarionte hospedera (Haraga et al., 2008). Se ha demostrado que estos sistemas son requeridos por *Salmonella* en distintas etapas de la infección (Galan & Curtiss, 1989). El T3SS codificado en la isla SPI-1 (T3SS-1) se expresa durante la fase intestinal de la infección (Galan & Curtiss, 1989), inyectando un conjunto de proteínas efectoras en las células epiteliales. Estas proteínas inducen el remodelamiento del citoesqueleto para generar la endocitosis

de la bacteria (Hardt et al., 1998; Patel & Galan, 2006). Una vez dentro de la célula hospedera, *Salmonella* reside dentro de un compartimento vacuolar en el cual toma importancia el T3SS codificado en la isla SPI-2 (T3SS-2) y sus proteínas efectoras (Hensel et al., 1997; Cirillo et al., 1998). La expresión del T3SS-2, activada en respuesta a un pH moderadamente ácido y deprivación de nutrientes, impide la fusión de este compartimento vacuolar con el lisosoma, lo que lleva a su maduración para generar la Vacuola Contenedora de *Salmonella* (SCV), donde la bacteria puede sobrevivir y replicarse (Rappl et al., 2003; Waterman & Holden, 2003). Hasta el día de hoy, se han descrito al menos 38 efectores que son secretados a través de estos sistemas (Ramos-Morales, 2012).

1.3 Biogénesis de la Vacuola Contenedora de *Salmonella*

La biogénesis de la SCV dentro de las células eucariontes es uno de los procesos fundamentales para la supervivencia intracelular de *Salmonella* en el hospedero (Creasey & Isberg, 2014). Este proceso es acompañado por la formación de distintos tipos de túbulos que se generan en/desde la SCV y permanecen conectados a ella (Schroeder et al., 2010). Sumado a esto, se ha reportado el movimiento de la SCV desde la cercanía de la membrana plasmática a una posición perinuclear (Ramsden et al., 2007); el reclutamiento de diversas GTPasas pequeñas de la familia Rab (Smith et al., 2005); la interacción con vías endocíticas y exocíticas; y la participación de efectores secretados por el T3SS-1 y T3SS-2. La biogénesis de la SCV se divide en tres etapas: temprana (menos de 1 h luego de la infección), intermedia (1 a 4 h) y tardía (más de 4 h) (**Figura 1**) (Steele-Mortimer et al., 1999). La etapa temprana depende de la acción de efectores secretados por el T3SS-1, entre los que destacan SopB y SptP. SopB hidroliza fosfoinosítidos PI(4,5)P₂, lo cual es necesario para la formación eficiente de la SCV (Terebiznik et al., 2002). Por su parte, SptP es una proteína activadora de GTPasas (GAP) que contribuye a disminuir la actividad de Cdc42 y Rac1 en la membrana plasmática revirtiendo los cambios en el citoesqueleto de actina, devolviendo la membrana a su estado normal (Fu et al., 1999).

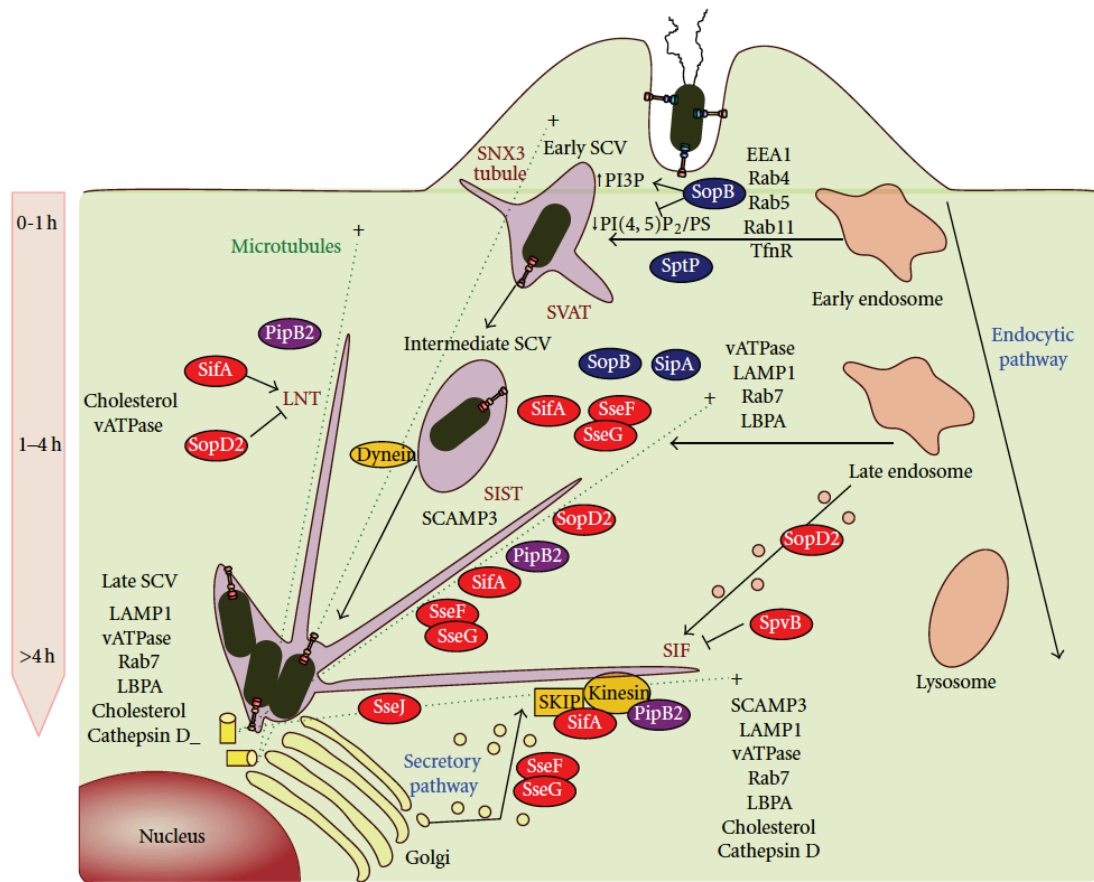


Figura 1. Biogénesis de la Vacuola Contenedora de *Salmonella*. Este proceso se inicia con la acción de los efectores secretados por el T3SS-1 (en azul), SopB y SptP, durante la invasión de la célula hospedera (0-1 h) y se caracteriza por la formación de túbulos asociados a vacuolas grandes (SVATs) y a la proteína SNX3 (túbulos SNX3). La etapa intermedia (1-4 h) requiere la participación de los efectores SipA y SopB secretados por el T3SS-1 y de los efectores secretados por el T3SS-2 (en rojo), SifA, SseF y SseG, para el posicionamiento perinuclear de la SCV. Diversos efectores participan en la fase final de la maduración y en la mantención de la SCV. La replicación intracelular de la bacteria se inicia 4 a 6 h posterior a la invasión y se forman distintos tipos de redes tubulares, como por ejemplo los SIFs. Los efectores involucrados son secretados por el T3SS-2 (en rojo) o por ambos T3SS (en morado). Obtenido desde Ramos-Morales, 2012.

La etapa intermedia se caracteriza por el movimiento de la SCV mediado por dineínas a una posición perinuclear, cercana al centro organizador de microtúbulos (Ramsden et al., 2007). En esta etapa, los efectores más importantes son SipA y SopB, secretados por el T3SS-1, junto con SifA, SseF y SseG, secretados por el T3SS-2. En la etapa tardía actúan distintos efectores secretados por el T3SS-2, los cuales ejercen acciones tanto agonistas como antagonistas entre ellos. En este grupo se encuentran PipB2, SifA, SopD2, SseF, SseG y SseJ (Ramos-Morales,

2012). Estos efectores permiten mantener la posición perinuclear de la SCV y la aparición de distintas redes de túbulos asociados a estas vacuolas especializadas. Dentro de estas redes se encuentran los “filamentos inducidos por *Salmonella*” (SIFs), que corresponden a túbulos membranosos que se extienden desde la SCV y poseen la misma composición que la membrana de este compartimento vacuolar (Drecktrah, et al., 2008, Steele-Mortimer, 2008). Por otra parte, se forman filamentos asociadas a proteínas llamadas Nexinas de *sorting* (SNXs) que están implicadas en el traspaso de distintos marcadores a los endosomas, siendo fundamentales en la maduración de la SCV (Bujny et al., 2008).

1.4 Participación del efector SopB en la biogénesis de la SCV

SopB es un efector que se encuentra codificado en la isla de patogenicidad SPI-5 y cumple múltiples funciones durante el proceso de infección, asociadas principalmente a su actividad fosfatidilinositol fosfatasa (Norris et al., 1998). En la etapa de invasión, SopB promueve el rearrreglo del citoesqueleto de actina de la célula hospedera a través de la activación indirecta de Rho GTPasas mediante la estimulación de su proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina (GEF) (Patel & Galán, 2006). Además, SopB hidroliza fosfoinositidos PI(4,5)P₂ presentes en la membrana plasmática, lo que promueve la fisión de dicha membrana facilitando el proceso de invasión (Terebiznik et al., 2002). En esta misma etapa, SopB es encargada de reclutar la proteína SNX18 a las ondulaciones de membrana producidas por la bacteria y a la SCV naciente, proceso que es dependiente de su actividad fosfatidilinositol fosfatasa. De esta forma, SopB promueve la formación de la SCV ya que SNX18 actúa como andamiaje para el reclutamiento de otras proteínas importantes en este proceso (Liebl et al., 2017). La disminución del fosfoinositido PI(4,5)P₂ reduce la carga negativa en la superficie de la SCV, lo que permite que se excluyan distintas proteínas del hospedero y por tanto se evita la fusión de este compartimento con los lisosomas (Bakowski et al., 2010). Al controlar la señalización de fosfoinositidos durante la invasión, SopB conduce a la activación de Akt (Steele-Mortimer et al., 2000) mediante la activación de las GTPasas RhoB y RhoH (Truong et al., 2018) y también a la señalización por la vía de MAPK y NF- κ B

(Bruno et al., 2009). Es más, R-Ras1 también contribuye a la activación de Akt de forma dependiente de SopB al promover la producción localizada de PI(3,4)P2 y PI(3,4,5)P3 (Truong et al., 2018). Debido a esto, se cree que SopB es el principal actor en los eventos de señalización y fosforilación inducidos durante la infección por *Salmonella* (Rogers et al., 2011).

Al avanzar en el proceso de maduración de la SCV, SopB se localiza en la membrana de este compartimento y recluta indirectamente a la GTPasa Rab5 al promover la fusión de la SCV con vesículas que contienen esta proteína. Rab5 a su vez recluta directamente a Vps34, que es una PI(3) quinasa que genera una acumulación de PI(3)P en la SCV (Mallo et al., 2008). El aumento de PI(3)P en la membrana de la SCV recluta a SNX1 y SNX3, ya que ambas se unen a este lípido de membrana. Estas son proteínas que modulan el tráfico intracelular de vesículas. SNX1 se ubica inicialmente en endosomas, y debido al aumento de PI(3)P es reclutada a la SCV. Esta proteína posee un módulo de unión a membrana adicional llamado BAR, que induce la formación de una red de túbulos de naturaleza vacuolar. Estos túbulos membranosos remueven parte de la membrana de la SCV, lo que lleva a la disminución de su tamaño. Sumado a esto, SNX1 es parte del complejo retrómero, el cual es un sistema necesario para devolver ciertos compuestos hacia la Red del Trans-Golgi (*Trans-Golgi Network*, TGN). Se ha demostrado que la formación de estos túbulos es necesaria para evitar la acumulación del receptor de manosa-6-fosfato (un marcador lisosomal) en la SCV (Bujny et al., 2008, García del Portillo & Finlay, 1995). SNX3 también forma una red de túbulos membranosos que promueve el reclutamiento de Rab7 y LAMP1 a la SCV durante el proceso de maduración (Braun et al., 2010), lo que permite la maduración de este compartimento. Esto indica que la actividad que ejerce SopB sobre los fosfoinosítidos en la membrana de la SCV le permite a *Salmonella* modificar la localización de las proteínas SNX1 y SNX3 e inducir una red de túbulos membranosos para promover la maduración de este compartimento vacuolar.

1.5 Interacción entre *Salmonella* y protozoos

Salmonella es un patógeno intracelular facultativo. Sin embargo, esta bacteria pasa la mayor parte de su ciclo de vida en el ambiente, donde puede ser fagocitada por organismos depredadores como los protozoos. Durante la evolución, muchas bacterias patógenas han desarrollado mecanismos para evitar la fagocitosis y sobrevivir al interior de estos organismos, utilizándolos como protección frente a condiciones ambientales adversas. De esta forma, los protozoos actúan como reservorios y posibles vectores de transmisión de estas bacterias, incluyendo a *Salmonella*. En el caso de *Legionella pneumophila*, la cual también es un patógeno intracelular, se han determinado en gran parte los mecanismos que utiliza para sobrevivir y replicarse en la ameba *Acanthamoeba castellanii* (Rowbotham, 1980). Esta bacteria requiere los mismos genes para sobrevivir intracelularmente en amebas y macrófagos (Gao et al., 1997; Segal & Shuman, 1999), lo cual indica que *Salmonella* hace uso de los mismos mecanismos para sobrevivir a la depredación por parte de ambos tipos celulares. Esto ha permitido su adaptación a nuevos hospederos, como lo son las células fagocíticas del sistema inmune humano. Por tanto, esto demuestra la importancia de determinar los mecanismos moleculares utilizados por patógenos, como *Salmonella*, para interactuar con protozoos ambientales. La comprensión de los mecanismos que utiliza *Salmonella* para sobrevivir en amebas y en otras células fagocíticas permitiría entender cómo esta bacteria evolucionó para colonizar hospederos complejos como el ser humano.

Existen estudios que relacionan a *Salmonella* con protozoos ambientales. El primero, publicado en 2003, demostró que *S. Typhimurium* puede replicarse en vacuolas contráctiles al interior de *Acanthamoeba polyphaga* (Gaze et al., 2003). Este antecedente destaca la importancia de los protozoos ambientales para la supervivencia de *Salmonella* en el ambiente. De la misma forma, otros estudios demostraron que diversos serovares de *Salmonella* sobreviven dentro de protozoos como *Acanthamoeba*, *Tetramitus*, *Naegleria*, *Hartmannella* y *Tetrahymena* (Bleasdale et al., 2009; Brandl et al., 2005; Feng et al., 2009; Gaze et al., 2003; Rehfuss et al., 2011; Tezcan-Merdol et al., 2004; Wildschutte et al., 2004;

Wildschutte & Lawrence, 2007). Además, se ha reportado que protozoos depredadores como *Naegleria* y *Acanthamoeba* pueden distinguir y optar por algunos serovares de *Salmonella* mediante el reconocimiento del antígeno O correspondiente (Wildschutte et al., 2004).

Con respecto a los mecanismos moleculares involucrados en la interacción de *Salmonella* con amebas, se demostró que la SPI-2 y el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ son esenciales para la supervivencia de *S. Typhimurium* al interior de *Acanthamoeba polyphaga*, mientras que la SPI-1 no lo es (Bleasdale et al., 2009). Esto se relaciona con el hallazgo previo que el factor transcripcional HilA (necesario para activar la expresión de genes de la SPI-1) no sería requerido para la internalización y supervivencia de *S. Dublin* en la ameba *Acanthamoeba rhysodes* (Tezcan-Merdol et al., 2004). En este mismo contexto, se estudió la importancia de genes de las islas SPI-1 y SPI-2 que codifican efectores en la infección de *A. polyphaga* con *S. Typhimurium*. Se determinó que existe una inducción de la transcripción de los genes *spiC* (localizado en la SPI-1) y *sseC* (localizado en la SPI-2) luego de la infección (Bleasdale et al., 2009). En otro estudio se determinó que los genes *sifB* y *sopB*, los cuales codifican efectores de gran importancia para la biogénesis de la SCV, se inducen durante la infección de *Tetrahymena* con *S. Typhimurium* (Rehfuss et al., 2011). Se ha demostrado que estos genes son necesarios para la infección de otros hospederos animales, como por ejemplo en macrófagos (Freeman et al., 2002; Ramos-Morales 2012). Esto refuerza la idea que *Salmonella* utiliza un repertorio similar de genes para infectar amebas y células fagocíticas de origen animal como macrófagos (Bleasdale et al., 2009; Rehfuss et al., 2011). Sin embargo, a la fecha falta dilucidar en profundidad los mecanismos moleculares que utiliza *Salmonella* para sobrevivir al interior de protozoos y el rol que tendrían los efectores secretados por ambos T3SS en este proceso.

1.6 *Dictyostelium discoideum* como un organismo modelo para estudiar la interacción de *Salmonella* con protozoos

La ameba social *Dictyostelium discoideum* está presente en el ambiente como un organismo unicelular mientras haya bacterias disponibles para alimentarse. Sin embargo, cuando éstas escasean, las células forman agregados pluricelulares, diferenciándose para formar diversas estructuras. Éstas van desde un cúmulo de células, pasando por distintos estados hasta llegar a formar los llamados cuerpos fructíferos. Este proceso se conoce como ciclo de desarrollo social (Eichinger, 2003). Esta ameba ha sido utilizada por años como un modelo para el estudio de procesos celulares como: fagocitosis y macropinocitosis, transducción de señales, motilidad celular y quimiotaxis, entre muchos otros. Además de esto, se ha empleado en el estudio de la interacción patógeno-hospedero (Steinert, 2011; Duhon & Cardelli, 2002; Bozzaro & Eichinger, 2011). Su uso como organismo modelo se debe a que puede ser cultivado fácilmente en el laboratorio, posee su genoma completamente secuenciado y están disponibles herramientas genéticas que permiten mutar genes de interés o expresar reporteros fluorescentes. Muchas de estas herramientas se pueden encontrar en un repositorio y base de datos internacional llamado “dictyBase” (<http://dictybase.org/>), en el cual se publica toda la información disponible a la fecha acerca de esta ameba, además de las distintas cepas y plasmidios disponibles para su uso (Fey et al., 2013).

La existencia de una interacción entre *S. Typhimurium* y *D. discoideum* ha sido discutida ampliamente en la literatura. Inicialmente se reportó que *S. Typhimurium* es fagocitada por *D. discoideum*, residiendo transientemente en un compartimento vacuolar en su interior y siendo posteriormente degradada por la ameba (Skriwan et al., 2002). En dichos estudios se utilizaron ensayos de protección a gentamicina, descubriéndose luego que este antibiótico podía ingresar a la ameba y eliminar la población intracelular de la bacteria casi en su totalidad (Sillo et al., 2011). Posteriormente, se demostró que *S. Typhimurium* sobrevive al interior de *D. discoideum* al mutar genes de la ameba que son esenciales para el proceso autofágico, indicando la importancia de este proceso en la supervivencia de la

bacteria en este hospedero (Jia et al., 2009). Además, se observó que *S. Typhimurium* inhibe la expresión de los genes relacionados con el ciclo social de esta ameba, lo cual provocó un impedimento de la formación de cuerpos fructíferos (Sillo et al., 2011). Otro artículo menciona que *S. Typhimurium* puede sobrevivir al interior de *D. discoideum* por al menos 6 h (Frederiksen & Leisner, 2015). Más recientemente, nuestro grupo describió que *S. Typhimurium* 14028s puede sobrevivir intracelularmente en *D. discoideum* (Riquelme et al., 2016) y que reside en un compartimento vacuolar al interior de esta célula hospedera (Valenzuela et al., 2021) (**Figura 2**).

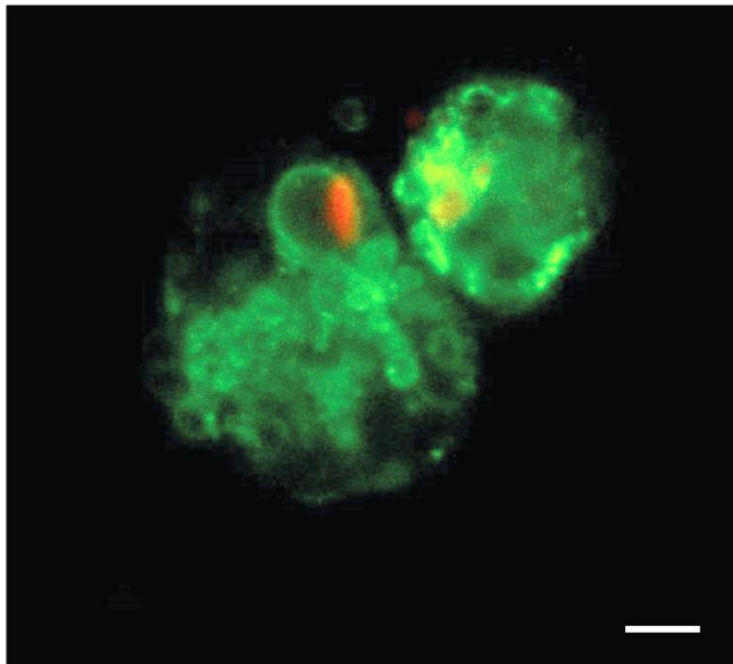


Figura 2. *S. Typhimurium* reside en un compartimento vacuolar rodeado por la ATPasa vacuolar VatM en *D. discoideum*. En la imagen se observa a *S. Typhimurium* 14028s dentro de una estructura vacuolar de *D. discoideum* a las 4,5 hpi. La fluorescencia verde corresponde a vacuolas VatM⁺ de la ameba y la fluorescencia roja corresponde al patógeno. Barra = 2 μ m. Adaptado de Valenzuela et al., 2021.

Mutantes de *S. Typhimurium* que poseen inactivado el T3SS-1 o el T3SS-2 tienen disminuida su supervivencia al interior de *D. discoideum*, por lo que esta bacteria requiere de ambos T3SS para dicho proceso (Riquelme et al., 2016). Además, mutantes de *S. Typhimurium* en las que se inactivan genes que codifican otros factores de virulencia relevantes en otros modelos de infección también presentan

defectos en su supervivencia intracelular en *D. discoideum* (Riquelme et al., 2016; Urrutia et al., 2018; Varas et al., 2018, Valenzuela et al., 2021). Estas observaciones respaldan el uso de este organismo como un modelo para el estudio de la interacción patógeno-hospedero con *Salmonella*, con el fin de evaluar el papel que juegan los efectores secretados por los T3SS de esta bacteria durante dicha interacción. Entre los efectores involucrados en la supervivencia intracelular de *Salmonella* en esta ameba destaca SopB. De hecho, nuestro grupo recientemente reportó que SopB contribuye a la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum* (**Figura 3**) y que requiere esta proteína efectora para modificar el proteoma de la SCV, lo que finalmente promueve la generación de un nicho replicativo estable para el patógeno al interior de este hospedero (Valenzuela et al., 2021).

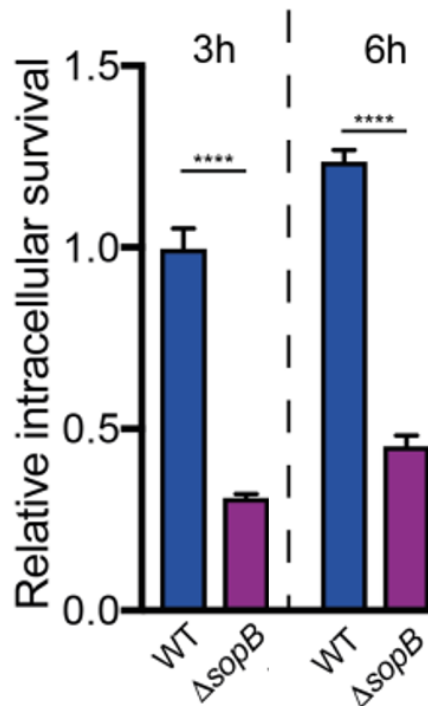


Figura 3. SopB contribuye a la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*. Se muestra la supervivencia intracelular expresada como UFC/célula a 3 o 6 hpi dividido por las UFC/célula a tiempo 0. Los gráficos muestran el promedio \pm SEM de al menos 3 ensayos independientes (* $P < 0,05$). Adaptado desde Valenzuela et al., 2021.

En base a los antecedentes presentados, esta tesis busca determinar el rol de SopB en la modificación de la composición lipídica de la SCV al interior de *D. discoideum* y en el destino de ésta al evitar la fusión con los lisosomas de la ameba. De esta forma, se busca determinar la contribución de SopB en la supervivencia intracelular de *Salmonella* en esta ameba al comprender su efecto al interior de la célula. Se espera que los resultados obtenidos permitan mejorar el entendimiento de los mecanismos que utiliza *Salmonella* para sobrevivir al interior de protozoos y contribuir al desarrollo de nuevas estrategias para el control de infecciones producidas por esta bacteria, como la detención de su ciclo de vida en el ambiente.

2. HIPÓTESIS

El efector SopB de *S. Typhimurium* contribuye a evitar la fusión de la Vacuola Contenedora de *Salmonella* con los lisosomas de *D. discoideum* y a la modificación de la composición lipídica de este compartimento vacuolar.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar si el efector SopB participa en el proceso de evasión de la fusión de la Vacuola Contenedora de *Salmonella* con los lisosomas de *D. discoideum* y en la modificación de los lípidos presentes en este compartimento vacuolar.

4. OBJETIVO ESPECÍFICOS

- 1.- Determinar si el efector SopB participa en evitar la fusión de la SCV con los lisosomas de *D. discoideum*.
- 2- Determinar si el efector SopB participa en alterar la composición lipídica de la SCV en *D. discoideum*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos

A continuación, se señalan los proveedores y los insumos adquiridos a partir de cada uno de ellos para el desarrollo de esta tesis.

De **BIOTIUM** (CA, USA) se obtuvo: tinción para ácidos nucleicos GelRed.

De **Becton, Dickinson and Company** (MD, USA) se obtuvo: Bacto-Agar.

De **Formedium, Ltd** (United Kingdom) se obtuvo: medio de cultivo LoFlo.

De **Gibco** (NY, USA) se obtuvo: azul de tripán.

De **Ibidi GmbH** (Germany) se obtuvo: placas μ -Slide de 8 pocillos.

De **IDT** (IO, USA) se obtuvo: oligonucleótidos partidores para PCR.

De **Invitrogen Life Technologies** (CA, USA) se obtuvo: *Taq* DNA polimerasa y agarosa ultrapura.

De **Merck** (NJ, USA) se obtuvo: cloruro de sodio (NaCl), sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), glucosa, cloruro de potasio (KCl), cloruro de magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$), glicerol, ácido clorhídrico fumante, hidróxido de sodio (NaOH), etanol absoluto, fosfato dipotásico trihidratado ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$), fosfato monopotásico (KH_2PO_4), sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), sulfato de potasio (K_2SO_4), fosfato disódico (Na_2HPO_4), carbonato de sodio (Na_2CO_3), peptona, extracto de levadura, solución amortiguadora TAE 50x y filtros Millipore con poros de 0,22 μm de diámetro.

De **New England Biolabs** (MA, USA) se obtuvo: estándares de peso molecular de DNA de 100 pb y 1 kb para electroforesis de ácidos nucleicos.

De **Promega** (WI, USA) se obtuvo: desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y *GoTaq* DNA polimerasa.

De **Qiagen** (CA, USA) se obtuvo: sistema comercial para extracción de DNA plasmidial *QIAprep Spin Miniprep Kit*.

De **Sigma Chemical Co.** (MO, USA) se obtuvo: kanamicina, ampicilina, gentamicina, G418 y estreptomicina.

De **Thermo Fisher Scientific** (MA, USA) se obtuvo: *Lysotracker Green*.

5.2 Condiciones de cultivo bacteriano

Las cepas bacterianas utilizadas en esta tesis se describen en la **Tabla 1**. Las bacterias se crecieron rutinariamente en caldo Luria-Bertani (LB; 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl) a 37°C con agitación. Cuando se requirió, el medio de cultivo se suplementó con ampicilina (Amp; 100 mg/L) o kanamicina (Kan; 50 mg/L). El medio de cultivo se solidificó agregando Bacto-Agar (15 g/L).

En el caso de los ensayos de infección para determinar la colocación de bacterias con lisosomas o la distribución de fosfoinosítidos específicos en compartimentos membranosos de *D. discoideum*, los inóculos bacterianos se prepararon en caldo LB suplementado en caso de ser requerido y se incubaron O/N con agitación a 37°C.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en esta tesis.

Cepa bacteriana	Característica	Origen
<i>Salmonella Typhimurium</i>		
14028s	Cepa silvestre virulenta	Stock del laboratorio
WT/pFCcGi	14028s transformada con pFCcGi	Este trabajo
Δ sopB	14028s Δ sopB::aph (Kan ^R)	Stock del laboratorio
Δ sopB/pFCcGi	14028s Δ sopB::aph (Kan ^R) transformada con pFCcGi	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
LMG194/pHK95	F ⁻ Δ (lacIPOZY)X74 galE galK thi rpsL Δ phoA ara714 transformada con pHK95	Weber et al., 2014
LMG194/pPH-PLC δ 1-GFP	F ⁻ Δ (lacIPOZY)X74 galE galK thi rpsL Δ phoA ara714 transformada con pPH-PLC δ 1-GFP	Weber et al., 2014
<i>Klebsiella aerogenes</i>		
DBS0349838	Cepa silvestre	dictyBase

5.3 Transformación de *S. Typhimurium* con DNA plasmidial para la obtención de mutantes

Para la obtención de mutantes de *S. Typhimurium*, se preparó un cultivo 1:100 a partir de un preinóculo bacteriano crecido O/N en caldo LB y se incubó con agitación a 30°C hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0,4-0,6. Se tomó 5 mL de este cultivo y se centrifugó a 13.000 rpm por 1 min a temperatura ambiente. El sedimento se lavó 6 veces con 1 mL de agua MiliQ estéril fría, se resuspendió en 95 μ L de agua MiliQ estéril y se transformó mediante electroporación con ~500 ng de DNA plasmidial. Para esto, la mezcla de bacterias y DNA plasmidial se trasladó a una cubeta de electroporación de 1 mm previamente enfriada a -20°C y se electroporó aplicando un voltaje de 1,8 kV en un equipo *E. coli Pulser* (Bio-Rad). Inmediatamente después de la electroporación, se añadió 900 μ L de caldo LB a la cubeta, se transfirió la mezcla a un tubo *snap cap* de 15 mL y se incubaron las bacterias por 1 h a 37°C con agitación. Posteriormente, se tomó 100 μ L de este cultivo y se sembró en agar

LB suplementado con el antibiótico correspondiente. El volumen restante se centrifugó a 13.000 rpm por 1 min a temperatura ambiente y el sedimento se resuspendió en 100 μ L de LB, los cuales se sembraron en agar LB suplementado con el antibiótico correspondiente. Las placas se incubaron a 37°C durante la noche. La presencia de una mutación se confirmó mediante amplificación por PCR, siguiendo el programa de amplificación descrito en la **Tabla 2**, y la mezcla de reacción en la **Tabla 3**, utilizando oligonucleótidos que flanquean los extremos 5' y 3' del marco de lectura abierto (ORF) del gen *sopB* (partidores *sopB_Out3* y *sopB_Out5*, respectivamente) o una mezcla entre el partidor *sopB_Out3* y un partidor que hibrida dentro del *cassette* de resistencia a Kan (K2) (**Tabla 4**).

Tabla 2. Programa de amplificación para PCR de colonias utilizando partidores *sopB_Out3-sopB_Out5* y *sopB_Out3-K2*.

Temperatura (°C)	Tiempo (min:s)	Ciclos
95	5:00	1
95	0:30	30
55	0:30	
72	1:00	
72	2:00	1
20	∞	-

Tabla 3. Mezcla de reacción para PCR de colonias utilizando partidores *sopB_Out3-sopB_Out5* y *sopB_Out3-K2*.

Reactivo	Volumen (μ L)	Concentración
Solución amortiguadora 5x	5	1x
MgCl ₂ (25 mM)	1,5	1,5 Mm
dNTPs 50x (10 mM c/u)	0,5	0,2 Mm
Partidor 1 (10 μ M)	0,5	0,2 Mm
Partidor 2 (10 μ M)	0,5	0,2 Mm
<i>GoTaq</i> DNA Polimerasa (5 U/ μ L)	0,2	0,04 U/ μ L
DNA (suspensión bacteriana)	0,5	-
H ₂ O libre de nucleasas	16,3	-

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en esta tesis.

Nombre	Secuencia 5' – 3'
<i>sopB_Out5</i>	AGAGACAAAAGCGGCAAAAA
<i>sopB_Out3</i>	GGCATAAAGGGACAGCACAT
K2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC

5.4 Plasmidios

Los diferentes plasmidios utilizados en esta tesis se presentan en la **Tabla 5**. Para la extracción de plasmidios, se utilizó el sistema comercial *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sedimentaron 5 mL de un cultivo O/N de la bacteria que contenía el plasmidio a purificar. El sedimento se resuspendió en 250 μ L de tampón P1 suplementado con RNasaA y reactivo *LyseBlue*. El volumen se trasladó a un tubo de microcentrífuga, donde se añadió 250 μ L de tampón P2 y se mezcló por inversión hasta la aparición de una coloración azul. Rápidamente, se añadió 350 μ L de tampón N3 y se mezcló por inversión hasta que desapareciera la coloración adquirida anteriormente. Cada tubo se centrifugó a $17.900 \times g$ por 10 min y se transfirieron 800 μ L del sobrenadante a una columna *QIAprep 2.0 spin column*. Cada columna se centrifugó por 1 min a $17.900 \times g$. Se descartó el volumen filtrado y se añadieron 750 μ L de tampón PE. Se centrifugó por 1 min a $17.900 \times g$ y se desechó el filtrado. Este paso se repitió una vez más para eliminar el líquido remanente. Luego, cada columna se transfirió a un tubo de microcentrífuga y se agregó 50 μ L de agua libre de nucleasas en el centro de la columna para la elución del DNA plasmidial. Se mantuvo en reposo por 5 min y finalmente se centrifugó por 1 min a $17.900 \times g$ para obtener una solución que contenía el plasmidio purificado. Esta solución se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3) para verificar la presencia del plasmidio y que correspondiera al tamaño molecular esperado.

Tabla 5. Plasmidios utilizados en esta tesis.

Plasmidio	Descripción	Origen
pFCcGi	Vector que contiene clonado el gen EGFP bajo el control del promotor inducible P_{BAD} y el gen mCherry bajo el control del promotor constitutivo de $rpsM$ (Amp^R)	Figueira et al., 2013
pHK95	Vector que codifica la sonda 2xFYVE-GFP para el reconocimiento de PI(3)P (Amp^R , G418 ^R)	Weber et al., 2014
pPH-PLCδ1-GFP	Vector que codifica la sonda PH-PLCδ1-GFP para el reconocimiento de PI(4,5)P2 (Amp^R , G418 ^R)	Weber et al., 2014

5.5 Electroforesis en geles de agarosa

El análisis de las muestras de DNA se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE (pH 8,3) que contenían el intercalante de material genético GelRed a una concentración 1x. Las muestras se resolvieron a 100 V por 30 min y se visualizaron en un transiluminador UV. La captura de imágenes se realizó utilizando un sistema de fotodocumentación microDOC (Clever Scientific).

5.6 Condiciones de cultivo de *D. discoideum*

Las cepas de *D. discoideum* utilizadas en esta tesis se describen en la **Tabla 6**. En primer lugar, se preparó un césped de *Klebsiella aerogenes* DBS0305928 en una placa de agar SM (10 g/L glucosa, 10 g/L peptona, 1 g/L extracto de levadura, 1 g/L $MgSO_4 \times 7H_2O$, 1,9 g/L KH_2PO_4 , 0,6 g/L K_2HPO_4 , 20 g/L Bacto-Agar), sobre el cual se mantuvieron creciendo las cepas de *D. discoideum* a 22°C. Previo a los ensayos de infección, el cultivo fue transferido a medio de cultivo HL5 líquido (14 g/L triptona, 7 g/L extracto de levadura, 0,35 g/L Na_2HPO_4 , 1,2 g/L KH_2PO_4 , 14 g/L glucosa, pH 6,3) suplementado con Str (300 mg/L) y Amp (100 mg/L). A partir de los siguientes subcultivos, el medio se mantuvo suplementado sólo con Amp. Estos cultivos se crecieron en un matraz o en una botella de cultivo celular. Para el primer caso, los cultivos se crecieron con agitación a 22°C y en condiciones axénicas (libres de bacterias) por al menos 3 subcultivos consecutivos (S1, S2, S3). Cada subcultivo se realizó una vez las amebas alcanzarán la fase exponencial

temprana ($1-2 \times 10^6$ células/mL). En caso de los cultivos realizados en botellas de cultivo, éstos se crecieron en condiciones axénicas a 22°C sin agitación por al menos 3 subcultivos consecutivos (S1, S2, S3) hasta lograr una confluencia entre el 90 y 100%. Para los ensayos de infección siempre se usaron amebas provenientes del 3^{er} (S3) al 6^{to} (S6) subcultivo.

Las cepas AX4/pHK95 y AX4/pPH-PLC δ 1-GFP, que se obtuvieron por transformación de la cepa AX4 mediante electroporación, se mantuvieron en medio líquido HL5 suplementado con Amp (100 mg/L) y G418 (10 mg/L). Para realizar los ensayos de infección, se utilizaron cultivos de estas cepas que se encontraran en el 1^{er} o 2^{do} subcultivo posterior al proceso de transformación, como se describe más adelante (sección 5.7).

Tabla 6. Cepas de *D. discoideum* utilizadas en esta tesis.

Cepa	Característica	Origen
AX4 (alias DBS0302402)	Cepa silvestre axénica (<i>axeA1</i> , <i>axeB1</i> , <i>axeC1</i>)	dictyBase
AX4/pHK95	Cepa derivada de AX4 que expresa la sonda 2xFYVE-GFP para el reconocimiento de PI(3)P (G418 ^R)	Weber et al., 2014
AX4/pPH-PLC δ 1-GFP	Cepa derivada de AX4 que expresa la sonda pPH-PLC δ 1-GFP para el reconocimiento de PI(4,5)P2 (G418 ^R)	Weber et al., 2014

5.7 Transformación de *D. discoideum* con DNA plasmidial

La transformación de *D. discoideum* con DNA plasmidial nunca se había realizado en nuestro laboratorio, por lo que se requirió estandarizar un protocolo (**Figura 4**) de acuerdo a lo descrito en la literatura (Weber et al., 2014). A partir de un cultivo S3 o superior que se encuentra en fase exponencial, se realizó un lavado con tampón de electroporación HG-50 1x (4,77 g/L HEPES, 0,58 g/L NaCl, 3,73 g/L KCl, 0,25 g/L MgSO₄, 0,53 g/L Na₂CO₃, 0,14 g/L NaH₂PO₄, pH 7,0) previamente enfriado a 4°C. Posteriormente, las células se resuspendieron en 4 mL de tampón HG-50 1x frío, obteniéndose una concentración aproximada de $2,5 \times 10^6$ células/mL. Para

realizar la transformación con DNA plasmidial se requirió al menos 1 mL de esta suspensión, la cual se mezcló con la cantidad necesaria de plasmidio. En caso de pHK95 se requirió 10 µg de plasmidio, mientras que para pPH-PLCδ1-GFP se requirió 50 µg de plasmidio. Esta mezcla se incubó por 15 min en hielo, se traspasó a una cubeta de electroporación de 1 mm previamente enfriada a -20°C y se electroporó aplicando dos pulsos con un voltaje de 0,85 kV y una capacitancia de 25 µF, dejando 5 s entre cada pulso, en el equipo *Gene Pulser* (Bio-Rad) acoplado a una unidad *Pulse Controller* y un *Capacitance Extender* (Bio-Rad). El contenido de la cubeta se trasladó a una botella de cultivo celular T75 con 9 mL de HL5 suplementado con 15,2 g/L de glucosa para la recuperación de la células transformadas y se incubó por 24 h a 22°C. Transcurrido este tiempo, se añadió G418 (10 mg/L) para seleccionar la presencia del plasmidio correspondiente y Amp (100 mg/L) para evitar contaminación bacteriana. Transcurridas 24 h, se realizó cambio de medio, con la misma concentración de antibióticos mencionados y 72 h después, se volvió a cambiar el medio de cultivo. Posterior a esto, se monitoreó el cultivo hasta que alcanzó entre el 90% y 100% de confluencia. Esta ventana de tiempo puede extenderse, dependiendo de la eficiencia de la transformación, entre 1 y 5 semanas. Al encontrarse entre un 90 y 100% confluyente, se realizó el primer subcultivo. Las cepas transformantes obtenidas sólo pueden ser utilizados para ensayos de microscopía confocal entre el primer y segundo subcultivo, ya que posterior a este periodo disminuye la intensidad de la fluorescencia asociada a las sondas codificadas en los plasmidios. Por tanto, los cultivos celulares posteriores al segundo subcultivo debieron ser descartados en cada ocasión.

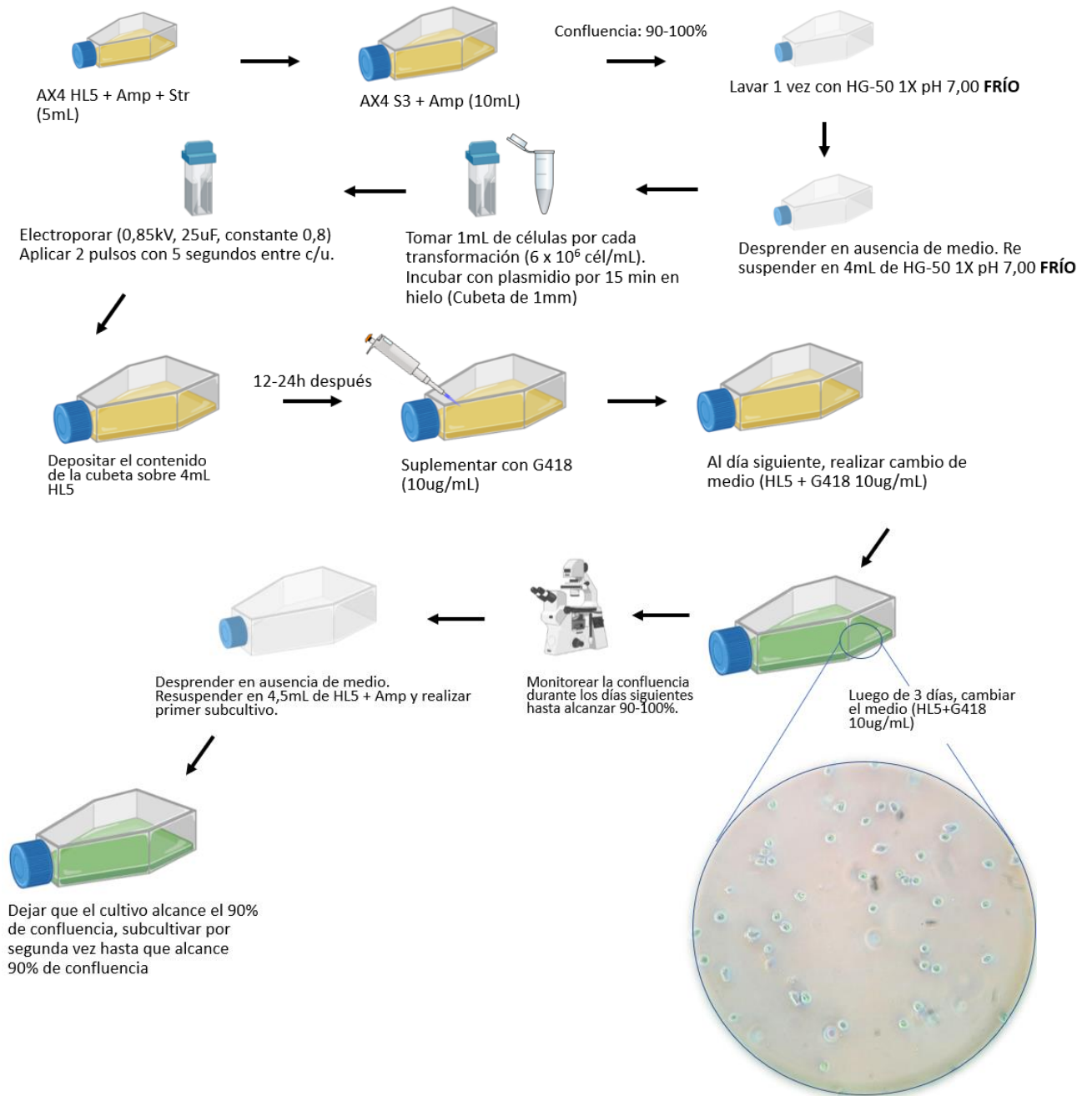


Figura 4. Transformación de *D. discoideum* con DNA plasmidial. Esquema del protocolo de transformación puesto a punto durante esta tesis, para la obtención de cepas transformantes de *D. discoideum*.

5.8 Ensayo de infección para determinar la colocalización de *S. Typhimurium* y los lisosomas de *D. discoideum* mediante microscopía confocal

Para evaluar si existe colocalización entre los lisosomas de *D. discoideum* y *S. Typhimurium*, se analizaron amebas infectadas con la cepa silvestre o la mutante $\Delta sopB$ mediante microscopía confocal. Para esto, se usó la cepa AX4 de *D. discoideum* a la cual se le añadió *Lysotracker Green* a una concentración de 1 μM al momento de ser infectada con las cepas de *S. Typhimurium* mencionadas. Previamente, ambas cepas bacterianas fueron transformadas mediante electroporación con el plasmidio pFCcGI que permite la expresión constitutiva de la proteína fluorescente mCherry (Figueira et al., 2013). Previo a la infección, las bacterias se cultivaron a 37°C por toda la noche en medio LB y cada cultivo se lavó 1 vez con tampón Soerensen (0,36 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 2 g/L KH_2PO_4 , pH 6,0). El sedimento bacteriano se resuspendió en 1 mL del mismo tampón.

Para realizar las infecciones se utilizó un cultivo axénico de *D. discoideum* crecido en matraz hasta alcanzar la fase exponencial. A partir de este cultivo, se sembraron $\sim 2,5 \times 10^5$ amebas por pocillo en medio HL5 suplementado con Amp (100 mg/L) en placas μ -Slide de 8 pocillos (Ibidi) y se incubaron durante toda la noche a 22°C. Al día siguiente, se observaron las placas con el microscopio óptico para corroborar que se encontraban células adheridas y que no existiera contaminación bacteriana. Cada pocillo a infectar se lavó 2 veces con tampón Soerensen. Se realizó la infección considerando una multiplicidad de infección (MOI) de 100 bacterias/ameba, las cuales se coincubaron por 1 h a 22°C para favorecer su interacción. Posteriormente, cada infección fue sometida a 4 lavados sucesivos con tampón Soerensen para eliminar las bacterias extracelulares. Se añadió el reactivo *Lysotracker Green* 1 μM disuelto en medio LoFlo (Formedium) a cada pocillo 30 minutos antes de la captura de imágenes. Posteriormente, se lavó cada pocillo una vez más con tampón Soerensen para eliminar el reactivo, manteniéndose finalmente en medio LoFlo. Las infecciones fueron monitoreadas y fotografiadas luego de 0,5 y 1 h de coincubación y se determinó el porcentaje de bacterias que colocalizaban con lisosomas (**Figura 5**). Las imágenes se obtuvieron usando un

microscopio Zeiss modelo LSM 710 equipado con un objetivo 40x. Para observar la fluorescencia asociada a GFP, las muestras se excitaron a 488 nm y la emisión se detectó en el rango entre 493 y 549 nm. Para visualizar la fluorescencia asociada a mCherry, las muestras se excitaron a 543 nm y la emisión se detectó en el rango entre 548 y 679 nm. Las imágenes obtenidas se analizaron mediante el *software* ImageJ 1.52i (Schindelin et al., 2012). La colocación de las bacterias y los lisosomas se validó mediante la determinación del coeficiente de Manders (Manders et al., 1992) usando el *plugin* JACoP de ImageJ 1.52i.

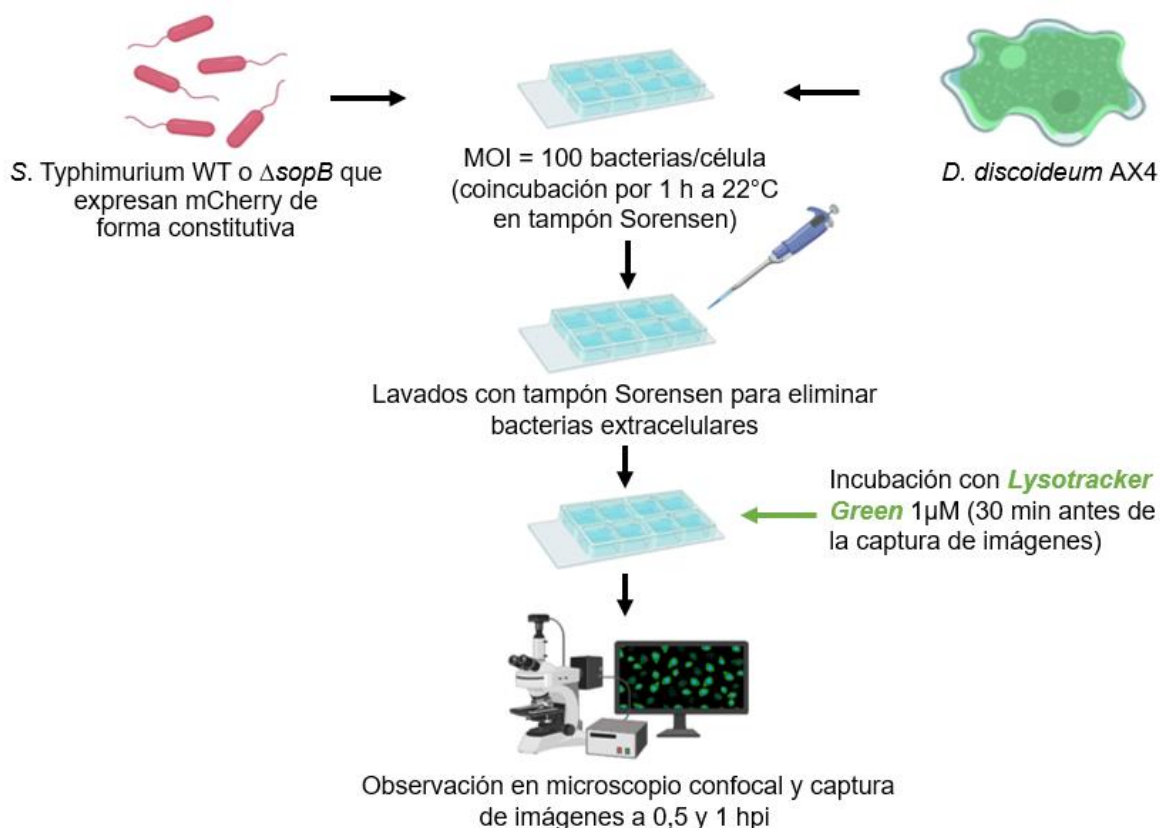


Figura 5. Ensayo de infección para determinar la colocación de *S. Typhimurium* con los lisosomas de *D. discoideum* mediante microscopía confocal. Se realizó un ensayo de infección entre una cepa de *D. discoideum* AX4 y la cepa silvestre o mutante Δ sopB de *S. Typhimurium*, con una MOI de 100 bacterias/célula. Luego del periodo de coincubación, se eliminaron las bacterias extracelulares mediante lavados sucesivos con tampón Soerensen y 30 minutos antes de la captura de imágenes se añadió *LysoTracker Green* 1 μ M a cada pocillo. Posteriormente, se capturaron imágenes a 0,5 y 1 hpi usando un microscopio confocal Zeiss modelo LSM 710 con un objetivo 40x.

5.9. Ensayo de infección para determinar la distribución de los fosfoinosítidos PI(3)P y PI(4,5)P2 en la SCV de *D. discoideum* mediante microscopía confocal

Para evaluar si existe un cambio en la distribución de fosfoinosítidos en la SCV de *D. discoideum*, se analizaron mediante microscopía confocal cepas transformantes de la ameba que expresan las sondas 2xFYVE-GFP y PH-PLC δ 1-GFP que reconocen PI(3)P y PI(4,5)P2 respectivamente, infectadas con la cepa silvestre y la mutante Δ *sopB* de *S. Typhimurium*. Para esto, se utilizaron cepas derivadas de *D. discoideum* AX4 que fueron transformadas por electroporación con plasmidios que codifican las sondas fusionadas a GFP mencionadas anteriormente. Ambas amebas transformantes fueron infectadas con las cepas de *S. Typhimurium* mencionadas, las cuales fueron transformadas previamente mediante electroporación con el plasmidio pFCcGI, que permite la expresión constitutiva de la proteína fluorescente mCherry (Figueira et al., 2013).

Para realizar las infecciones, se utilizaron cultivos axénicos de *D. discoideum* transformados con los plasmidios que expresan estas sondas, crecidos en matraz hasta alcanzar la fase exponencial. A partir de este cultivo, se sembraron $\sim 2,5 \times 10^5$ amebas por pocillo en medio HL5 suplementado con Amp (100 mg/L) en placas μ -Slide de 8 pocillos (Ibidi) y se incubaron durante toda la noche a 22°C. Al día siguiente, se observaron las placas con el microscopio óptico para corroborar que se encontraban células adheridas y que no existiera contaminación bacteriana. Cada pocillo a infectar se lavó 2 veces con tampón Soerensen. Se realizó la infección considerando una MOI de 100 bacterias/ameba, las cuales se coincubaron por 1 h a 22°C para favorecer su interacción. Posteriormente, cada infección fue sometida a 4 lavados sucesivos con tampón Soerensen para eliminar las bacterias extracelulares. Las infecciones fueron monitoreadas y fotografiadas luego de 0,5, 1 y 2 h de incubación cuando se analizó la presencia de PI(3)P, y 0,5 y 1 h de incubación cuando se analizó la presencia de PI(4,5)P2. En ambos casos, se determinó el porcentaje de bacterias que se localizaban en estructuras membranosas positivas para estos fosfoinosítidos (**Figura 6**). Las imágenes se

obtuvieron usando un microscopio Zeiss modelo LSM 710 equipado con un objetivo 100x. Para observar la fluorescencia asociada a GFP, las muestras se excitaron a 488 nm y la emisión se detectó en el rango entre 493 y 549 nm. Para visualizar la fluorescencia asociada a mCherry, las muestras se excitaron a 543 nm y la emisión se detectó en el rango entre 548 y 679 nm. Las imágenes obtenidas se analizaron mediante el *software* ImageJ 1.52i (Schindelin et al., 2012).

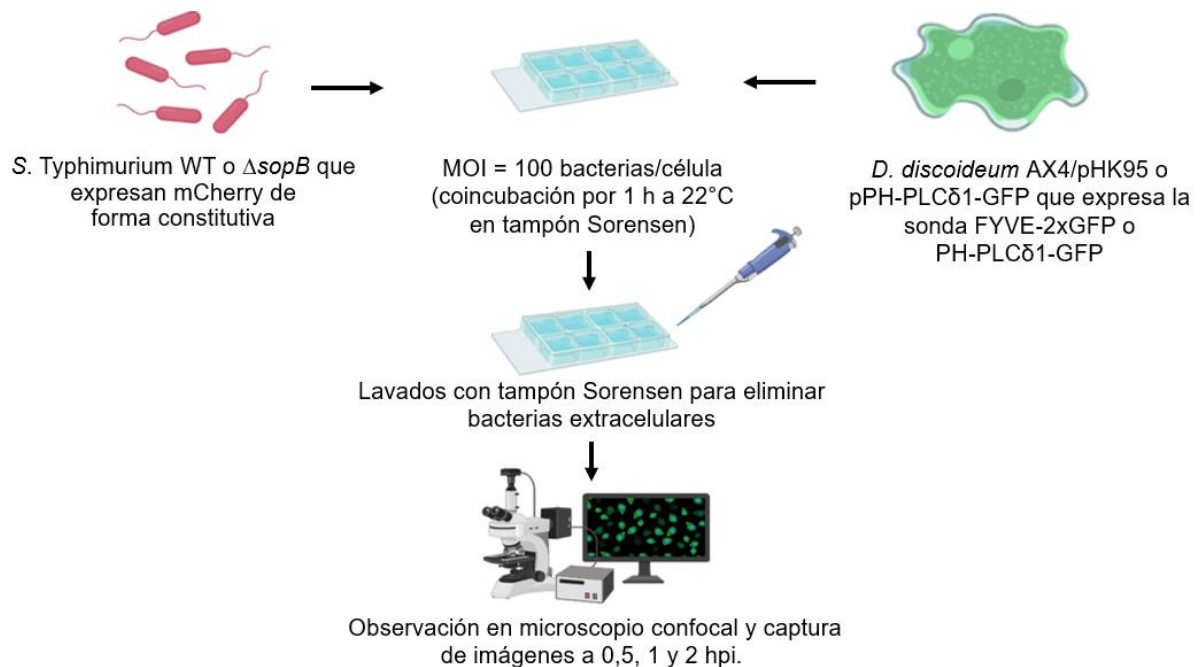


Figura 6. Ensayo de infección para determinar la distribución de los fosfoinosítidos PI(3)P y PI(4,5)P2 en la SCV de *D. discoideum* mediante microscopía confocal. Se realizó un ensayo de infección utilizando una cepa de *D. discoideum* transformada con los plasmidios pHK95 o pPH-PLC δ 1-GFP para poder observar los fosfoinosítidos PI(3)P y PI(4,5)P2, respectivamente, y la cepa silvestre o mutante $\Delta sopB$ de *S. Typhimurium* usando una MOI de 100 bacterias/célula. Luego del periodo de coincubación, se eliminaron las bacterias extracelulares mediante lavados sucesivos con tampón Soerensen. Posteriormente, se capturaron imágenes a 0,5, 1 y 2 hpi para detectar PI(3)P, y 0,5 y 1 hpi para detectar PI(4,5)P2 usando un microscopio confocal Zeiss modelo LSM 710 con un objetivo 100x.

5.10 Análisis estadístico

Todos los experimentos de esta tesis se realizaron al menos 3 veces en días distintos (réplicas biológicas). Los valores reportados en las figuras corresponden a promedios \pm el error estándar (SEM) correspondiente. Para establecer la significancia estadística de las diferencias observadas entre las distintas condiciones, los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías y el test de comparaciones múltiples de Šídák utilizando el *software* GraphPad Prism 9.0. Los análisis se realizaron utilizando los parámetros establecidos por defecto, considerando diferencias estadísticamente significativas cuando se obtuvieron valores de $P < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Determinar si el efector SopB participa en evitar la fusión de la SCV con los lisosomas de *D. discoideum*

Para determinar si el efector SopB es requerido para evitar la fusión de la SCV con los lisosomas de *D. discoideum*, se utilizó una mutante de la colección del laboratorio que posee una delección del gen que codifica dicho efector, la cual se generó mediante el método de recombinación “*Red-swap*” (Datsenko & Wanner, 2000). Este método consiste en reemplazar el ORF de un gen de interés por un *cassette* de resistencia a Kan, flanqueado por sitios FRT. La delección del gen *sopB* en la mutante se confirmó mediante PCR de colonias. Al utilizar partidores que flanquean los extremos 5' y 3' del gen en cuestión (*sopB_Out5* y *sopB_Out3*, respectivamente), se observa para la cepa silvestre una amplificación ligeramente por sobre los 2000 pares de bases (bp), mientras que para la mutante Δ *sopB* el tamaño del amplicón es muy similar, ya que los alelos intercambiados son de tamaño similar (**Figura 7**). Debido a esto, se utilizó un partidor que hibrida en una región interna del *cassette* de resistencia a Kan (K2) junto con el partidor que flanquea el gen *sopB* por su extremo 3' (*sopB_Out3*). Este conjunto de partidores solo amplifica en la cepa Δ *sopB* la cual contiene este gen de resistencia, no así en la cepa silvestre (**Figura 7**).

Una vez confirmado el genotipo de la mutante Δ *sopB*, ésta y la cepa silvestre de *S. Typhimurium* se transformaron con el plasmidio pFCcGi. Este plasmidio permite la expresión constitutiva de la proteína fluorescente roja mCherry (Figueira et al., 2013), lo que permite observar las bacterias transformantes mediante microscopía de fluorescencia. La transformación con este plasmidio se confirmó en ambos casos, ya que las cepas adquirieron resistencia a Amp, además de formar colonias con una coloración rojiza en agar LB. Por otra parte, para la observación de compartimentos lisosomales en *D. discoideum* se utilizó el reactivo *Lysotracker Green*, que marca con fluorescencia verde estos organelos en las células tratadas. De esta forma, se

pueden observar y diferenciar tanto los lisosomas como las bacterias, lo que es esencial para la realización de este objetivo.

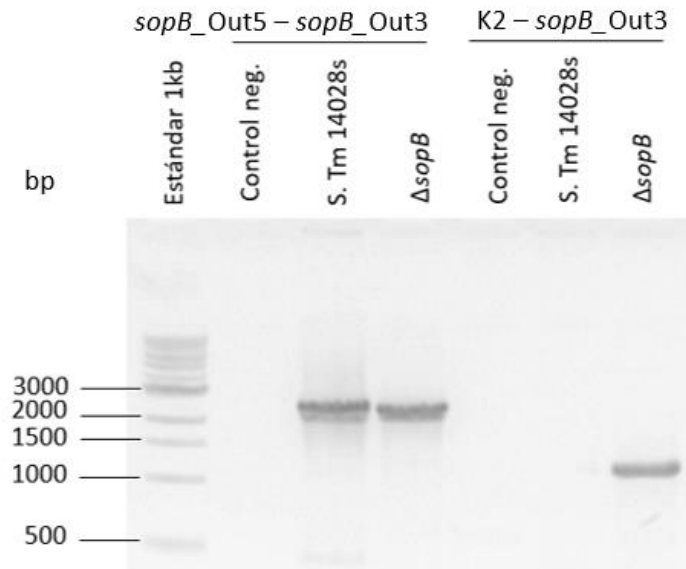


Figura 7. Confirmación del genotipo de la mutante Δ sopB derivada de S. Typhimurium 14028s. PCR de colonias de la cepa silvestre y la mutante Δ sopB de S. Typhimurium utilizando partidores que flanquean los extremos 5' y 3' del gen mutado (*sopB_Out5* y *sopB_Out3*, respectivamente) o una combinación de un partidor interno del *cassette* de resistencia a Kan y el partidor que flanquea al gen *sopB* por su extremo 3' (K2 y *sopB_Out3*, respectivamente).

Previamente, se debió estandarizar los ensayos en presencia de *Lysotracker Green* ya que no había sido utilizado anteriormente en nuestro laboratorio. Para ello, se determinó la concentración del reactivo a utilizar y el tiempo de incubación con este reactivo para que la marca fluorescente se viera lo más nítida posible. De esta forma, se ensayaron soluciones del reactivo a 0,1 μ M por 120 minutos (**Figura 8A**), 1 μ M por 15, 30 y 60 minutos (**Figura 8B**) y 2 μ M por 60 minutos (**Figura 8C**). Con la concentración de *Lysotracker Green* 1 μ M por 30 minutos se obtuvo una imagen mejor resuelta, donde se observa un borde definido del organelo en estudio (flechas blancas), en cambio bajo las otras condiciones se observó un halo alrededor de los lisosomas, perdiéndose la frontera de los mismos (flechas rojas).

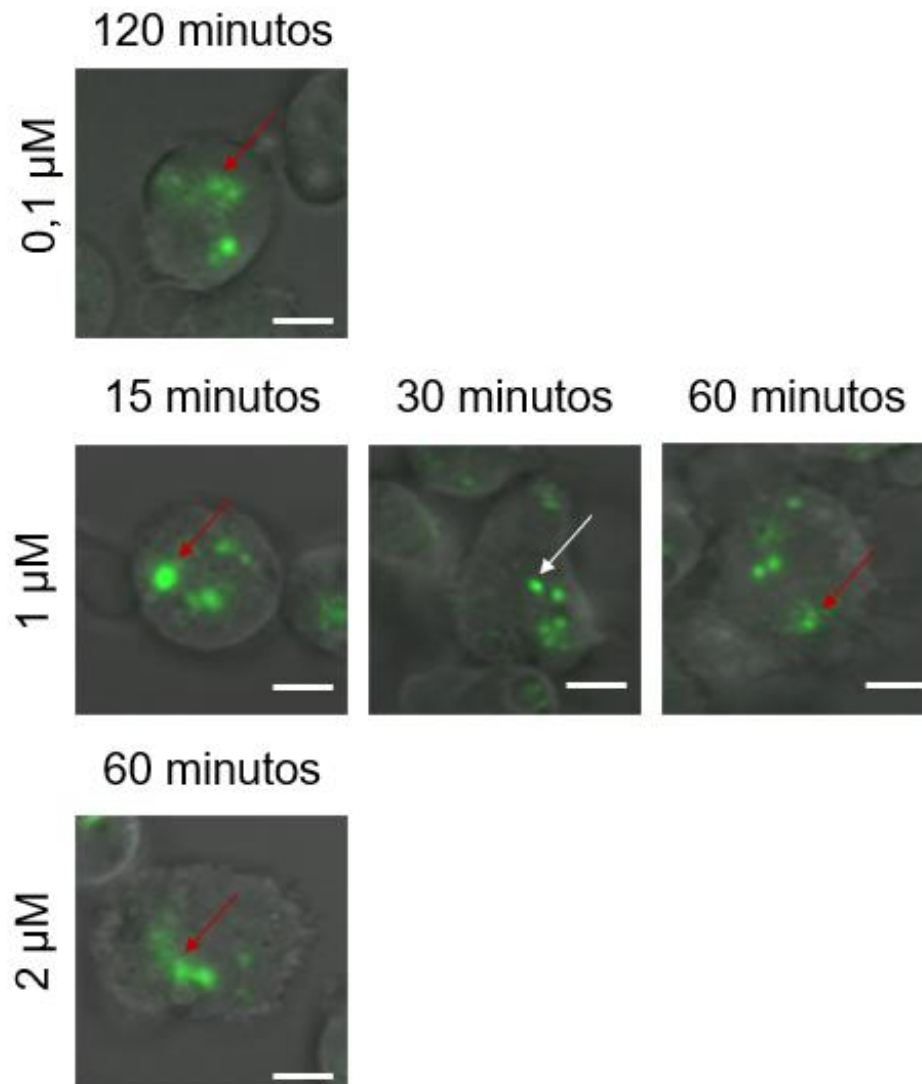
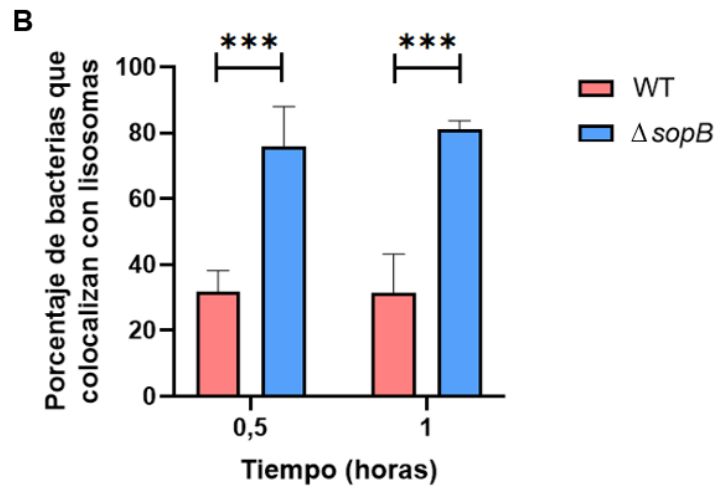
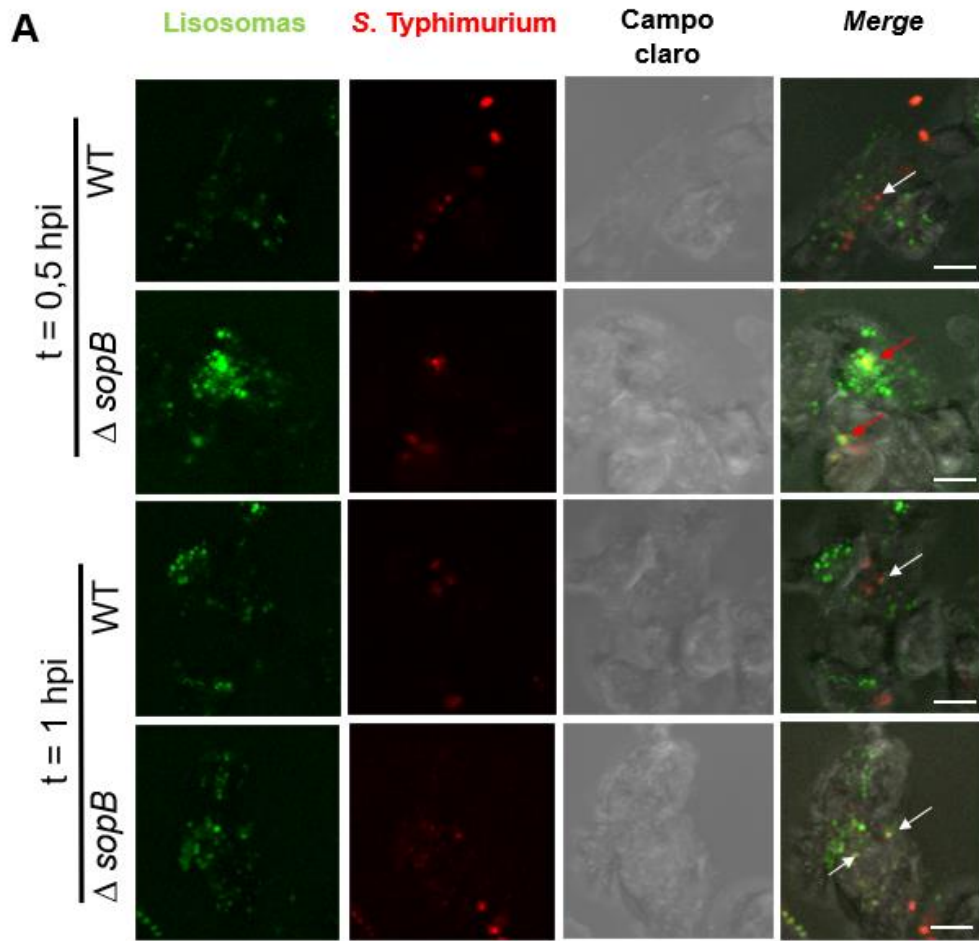


Figura 8. Estandarización de ensayo con *LysoTracker Green* en *D. discoideum*. Fotos representativas de la incubación de *D. discoideum* con *LysoTracker Green* a las concentraciones y tiempos indicados. Las flechas blancas indican lisosomas con una frontera definida, mientras que las flechas rojas indican el halo difuso alrededor de ellos. Barra = 5 μm .

Posteriormente, se realizaron ensayos de infección de *D. discoideum* en presencia del reactivo *LysoTracker Green* utilizando ambas cepas de *S. Typhimurium* para evaluar si existe colocalización entre los lisosomas (marca fluorescente verde) y las bacterias intracelulares (marca fluorescente roja). Cada infección se observó mediante microscopía confocal a 0,5 y 1 hpi y se determinó el porcentaje de bacterias que colocalizan con lisosomas, analizándose al menos 15 amebas

infectadas por cada condición (**Figura 9**). Los resultados muestran que la cepa silvestre presenta menor proporción de bacterias que colocalizan con los compartimentos lisosomales (flechas blancas) que la mutante $\Delta sopB$, observándose para esta última una mayor proporción de estructuras que presentan colocalización de la marca verde y roja (flechas rojas) a 0,5 y 1 hpi (**Figura 9A**). Se cuantificaron las estructuras que presentan colocalización de la marca verde y roja para ambas condiciones y los resultados muestran que el porcentaje de bacterias intracelulares que colocalizan con lisosomas es significativamente más alto en las infecciones realizadas con la mutante $\Delta sopB$ en comparación con la cepa silvestre a 0,5 y 1 hpi (**Figura 9B**). Adicionalmente, se realizó la cuantificación de la colocalización entre bacterias y lisosomas mediante la obtención de un coeficiente de Manders de verde sobre rojo (**Figura 9C**) y de rojo sobre verde (**Figura 9D**). A medida que el coeficiente aumenta, también lo hace el porcentaje de colocalización (Manders et al., 1992). Estos coeficientes fueron significativamente mayores para la mutante $\Delta sopB$ a 0,5 y 1 hpi, en comparación con la cepa silvestre. Estos análisis indican que la colocalización entre bacterias intracelulares y lisosomas es mayor en la mutante $\Delta sopB$ que en la cepa silvestre, sugiriendo que el efector SopB de *S. Typhimurium* es requerido para evitar la fusión de la SCV con los lisosomas de *D. discoideum*.



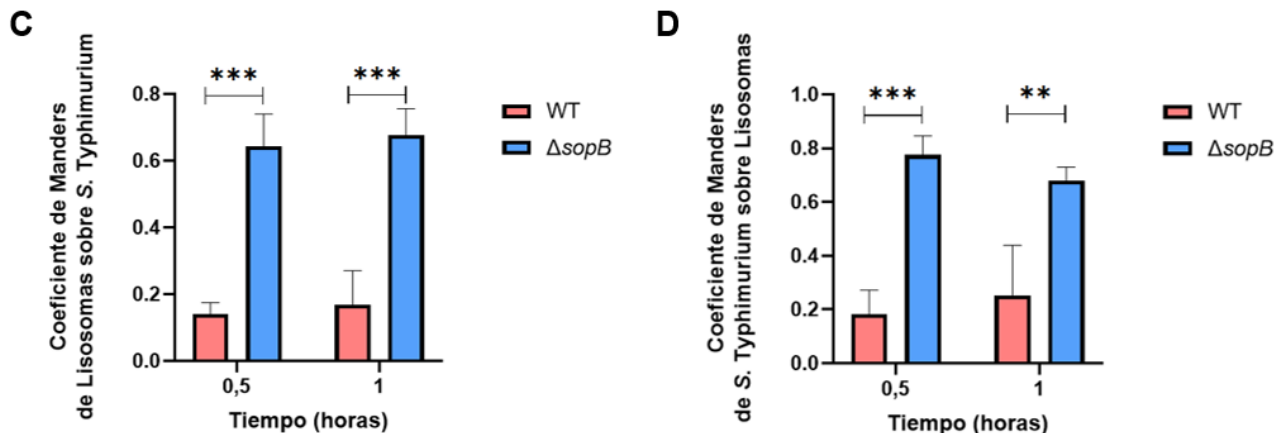


Figura 9. El efector SopB contribuye a evitar la colocación de *S. Typhimurium* con estructuras lisosomales de *D. discoideum* a 0,5 y 1 hpi. Se utilizó *S. Typhimurium* silvestre (WT) o Δ sopB que expresa constitutivamente mCherry para infectar la cepa AX4 de *D. discoideum* en presencia del reactivo *Lysotracker Green*. Posteriormente, se obtuvo imágenes utilizando un microscopio confocal Zeiss modelo LSM 700 equipado con un objetivo 40x. (A) Fotos representativas obtenidas a 0,5 y 1 hpi usando la cepa WT/pFCcGi y Δ sopB/pFCcGi. Las flechas rojas indican bacterias que colocaliza con los lisosomas de la ameba y las flechas blancas indican bacterias que no colocalizan con estos compartimentos. Barra = 5 μ m. (B) Se identificaron al menos 15 amebas infectadas con cada cepa analizada y se calculó el porcentaje de bacterias que colocalizan con estructuras lisosomales. Las barras de cada gráfico corresponden al promedio de 3 réplicas biológicas \pm SEM. La significancia estadística se determinó usando un ANOVA de 2 vías y el test de comparaciones múltiples de Šidák (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). (C) y (D) muestra el coeficiente de Manders obtenido desde las imágenes de microscopía confocal para determinar la colocación de *S. Typhimurium* y los lisosomas de *D. discoideum*. Se muestra el coeficiente de Manders obtenido sobre un plano medial para los lisosomas sobre *S. Typhimurium* (verde sobre rojo) a 0,5 y 1 hpi (C), y el coeficiente de Manders obtenido sobre un plano medial de *S. Typhimurium* sobre los lisosomas de la ameba (rojo sobre verde) a 0,5 y 1 phi (D). Se analizaron al menos 15 amebas infectadas con cada cepa estudiada. La significancia estadística se determinó usando un ANOVA de 2 vías y el test de comparaciones múltiples de Šidák (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

6.2 Determinar si el efector SopB participa en alterar la composición lipídica de la SCV en *D. discoideum*

Frente a la infección con *S. Typhimurium*, en células de mamíferos se produce un cambio en la composición de los fosfoinosítidos presentes en estructuras membranosas, como la membrana plasmática y compartimentos vacuolares internos. Por tanto, nos propusimos evaluar si esto también ocurre en *D. discoideum*. Para el estudio de la composición lipídica de estos distintos compartimentos en *D. discoideum*, se utilizaron las sondas 2xFYVE-GFP y PH-PLC δ 1-GFP, que incluyen dominios de proteínas que se unen específicamente a PI(3)P y PI(4,5)P₂, respectivamente, fusionadas a GFP. De esta forma, las sondas mencionadas

permiten la detección de estos fosfoinosítidos mediante microscopía de fluorescencia. Estas fusiones se expresan de forma constitutiva y se encuentran codificadas en los plasmidios pHK95 y pPH-PLC δ 1-GFP, respectivamente. Para poder estudiar la dinámica de fosfoinosítidos en *D. discoideum*, se debió transformar la ameba con estos plasmidios. Para ello, se estandarizó el protocolo de transformación de *D. discoideum* con DNA plasmidial mediante electroporación. Esto requirió de un electroporador con control de capacitancia. Se determinó que el proceso debe realizarse a 0,85 kV y 25 μ F, mediante la aplicación de 2 pulsos con un descanso de 5 segundos entre ellos. Además, se determinó la cantidad de DNA plasmidial necesaria para una transformación eficiente, la cual fue de 5 μ g para pHK95 y 50 μ g para pPH-PLC δ 1-GFP. A partir de este nuevo protocolo, se logró transformar la cepa AX4 de *D. discoideum* con los plasmidios que codifican las sondas mencionadas. Las imágenes de microscopía de epifluorescencia muestran amebas que presentan fluorescencia verde, confirmando que expresan cada una de las sondas asociadas a GFP (**Figura 10**).

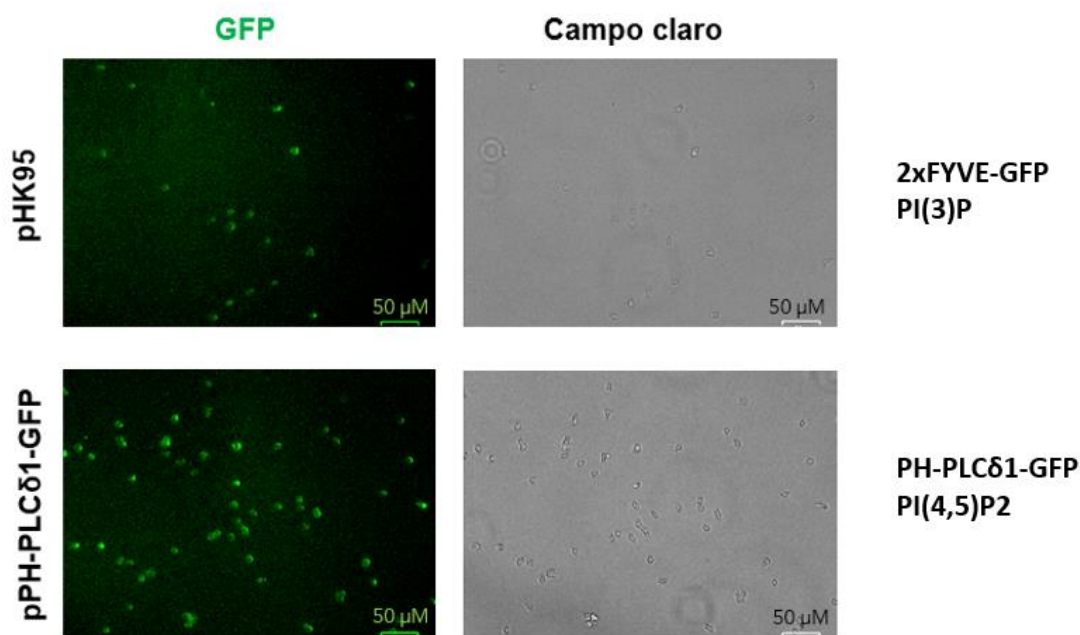


Figura 10. *D. discoideum* expresa las sondas fluorescentes asociadas a GFP para detectar PI(3)P y PI(4,5)P2. Se observaron las cepas transformantes AX4/pHK95 y AX4/pPH-PLC δ 1-GFP crecidas a 22°C. Las micrografías confirman la presencia de células que presentan fluorescencia verde producto de la expresión de las sondas para los fosfoinosítidos de interés. Las imágenes fueron capturadas utilizando un equipo ZOE Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad). Barra = 50 μ m.

Para determinar las estructuras subcelulares a las cuales se asocian estas sondas, las cepas transformantes de *D. discoideum* se observaron mediante microscopía confocal. En el caso de las amebas que expresan la sonda 2xFYVE-GFP, se observaron estructuras vacuolares que presentan marca fluorescente verde, las cuales corresponden a vacuolas PI(3)P⁺ (**Figura 11**, panel superior). Por su parte, en el caso de las amebas que expresan la sonda PH-PLCδ1-GFP la marca fluorescente verde se encuentra asociada al contorno de la célula, lo que indica que se trata de la membrana plasmática donde se localiza principalmente PI(4,5)P₂, no así a estructuras vacuolares internas (**Figura 11**, panel inferior).

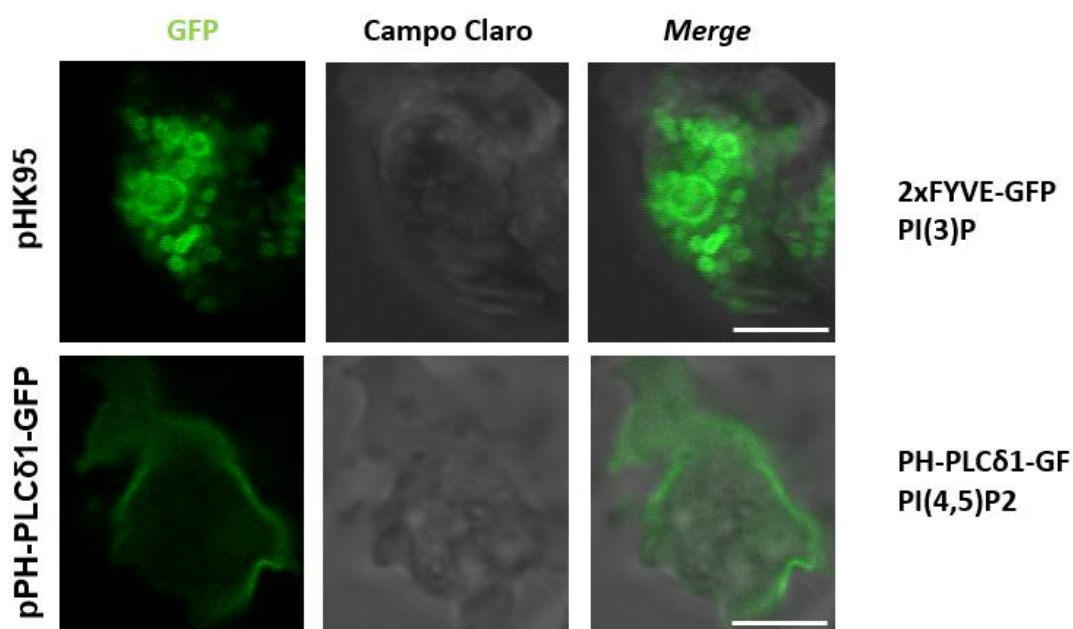
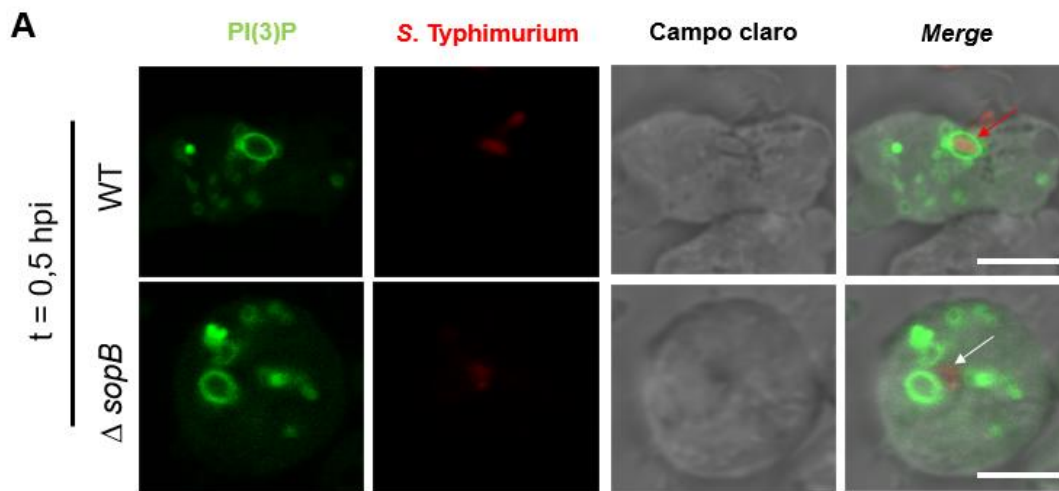
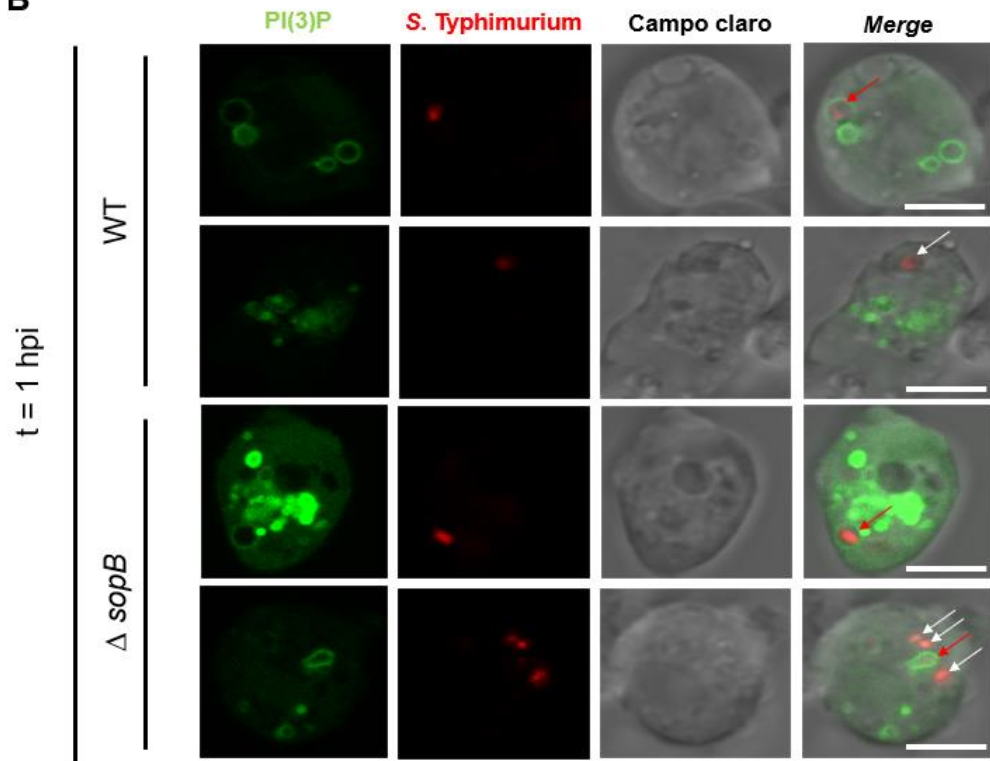
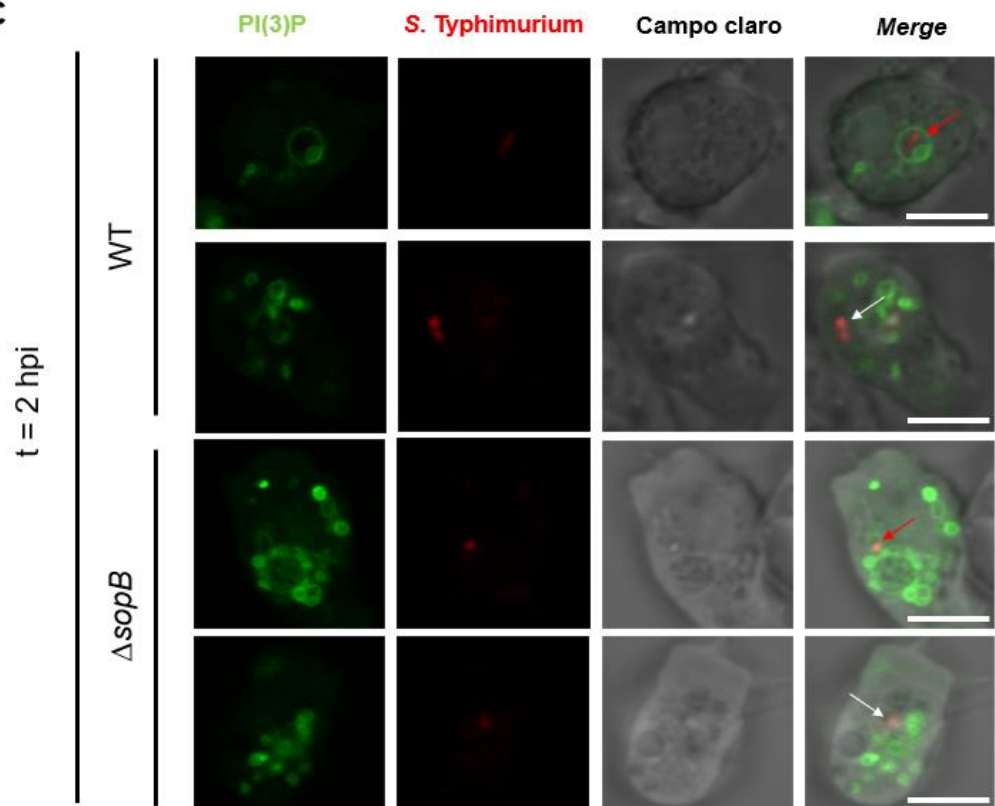


Figura 11. Las sondas 2xFYVE-GFP y PH-PLCδ1-GFP se asocian a distintas estructuras membranosas en *D. discoideum*. Se observaron las cepas transformantes AX4/pHK95 y AX4/pPH-PLCδ1-GFP crecidas a 22°C. La figura muestra la asociación de la sonda 2xFYVE-GFP a vacuolas y la asociación de la sonda PH-PLCδ1-GFP a la membrana plasmática. Las imágenes fueron capturadas mediante microscopía confocal utilizando un microscopio Zeiss modelo LSM 700 equipado con un objetivo 100x. Barra = 5 µm.

Posteriormente, se realizaron ensayos de infección de *D. discoideum* AX4/pHK95 con la cepa silvestre y la mutante $\Delta sopB$ de *S. Typhimurium* para evaluar si existen bacterias (marca fluorescente roja) que residen en estructuras vacuolares PI(3)P⁺ (marca fluorescente verde). Cada infección se observó mediante microscopía confocal a 0,5, 1 y 2 hpi y se determinó el porcentaje de bacterias que residen al

interior de estas estructuras, analizándose al menos 10 amebas infectadas por cada condición (**Figura 12**). Los resultados muestran que a 0,5 hpi existe una mayor proporción de bacterias dentro de vacuolas PI(3)P⁺ (flechas rojas) en el caso de la cepa silvestre en comparación con la mutante $\Delta sopB$ (rojo), donde las bacterias se observan frecuentemente fuera de estas estructuras (flechas blancas) (**Figura 12A**). Por su parte, a 1 y 2 hpi (**Figura 12B y 12C**, respectivamente) se observa que existe una proporción similar de bacterias que residen dentro y fuera de vacuolas PI(3)P⁺, tanto para la cepa silvestre como para la mutante $\Delta sopB$. Estos datos se cuantificaron en ambas condiciones y los resultados muestran que el porcentaje de bacterias que residen al interior de vacuolas PI(3)P⁺ es significativamente distinto entre la cepa silvestre y la mutante $\Delta sopB$ a 0,5 hpi y no es significativamente distinto a 1 y 2 hpi (**Figura 12D**).



B**C**

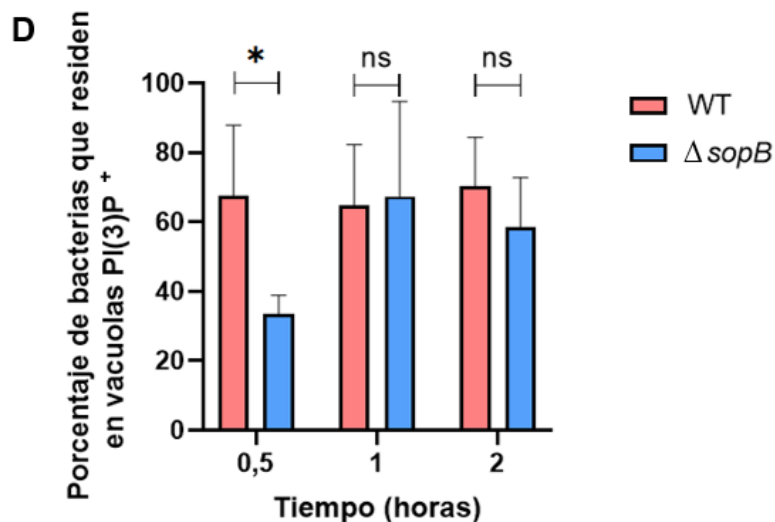


Figura 12. El efector SopB participa en la distribución del PI(3)P hacia la SCV en *D. discoideum* a 0,5 hpi. Se utilizó *S. Typhimurium* silvestre (WT) o $\Delta sopB$ que expresa constitutivamente mCherry para infectar la cepa *D. discoideum* AX4/pHK95. Posteriormente, se obtuvieron imágenes utilizando un microscopio confocal Zeiss modelo LSM 700 equipado con un objetivo 100x. Se muestran imágenes representativas obtenidas a las 0,5 (A), 1 (B) y 2 hpi (C) usando las cepas WT/pFCcGi y $\Delta sopB$ /pFCcGi. Las flechas rojas indican bacterias que se encuentran al interior de vacuolas PI(3)P⁺ y las flechas blancas indican bacterias que no se encuentran dentro de estos compartimentos. (D) Se identificaron al menos 10 amebas infectadas con cada cepa bacteriana analizada y se calculó el porcentaje de bacterias que residen en vacuolas PI(3)P⁺. Las barras de cada gráfico corresponden al promedio de 4 réplicas biológicas \pm SEM. La significancia estadística se determinó usando un ANOVA de 2 vías y el test de comparaciones múltiples de Šidák (* $P < 0,05$; ns = no significativo). Barra = 5 μ m.

Se ha demostrado que los niveles de PI(4,5)P₂ disminuyen en la membrana plasmática como resultado de la internalización de *S. Typhimurium* en células de mamíferos y que SopB contribuye a este proceso (Terebiznik et al., 2002). Por esto, se realizaron ensayos de infección de *D. discoideum* AX4/pPH-PLC δ 1-GFP con la cepa silvestre y la mutante $\Delta sopB$ de *S. Typhimurium* para estudiar si al ser fagocitada la bacteria (rojo), se redistribuía el fosfoinosítido PI(4,5)P₂ (verde) desde la membrana plasmática. Cada infección se observó mediante microscopía confocal, capturándose imágenes cada 10 s por al menos 1 h. Se obtuvo una observación para la mutante $\Delta sopB$ en la cual la bacteria es internalizada, concentrando una marca fluorescente intensa a los 10 s, la cual disminuye pasados otros 10 s. En el caso de la cepa silvestre no se pudo observar este fenómeno. Sin embargo, este resultado muestra que el fosfoinosítido PI(4,5)P₂ es redistribuido desde la

membrana plasmática de *D. discoideum* al ocurrir una infección con *S. Typhimurium* (Figura 13).

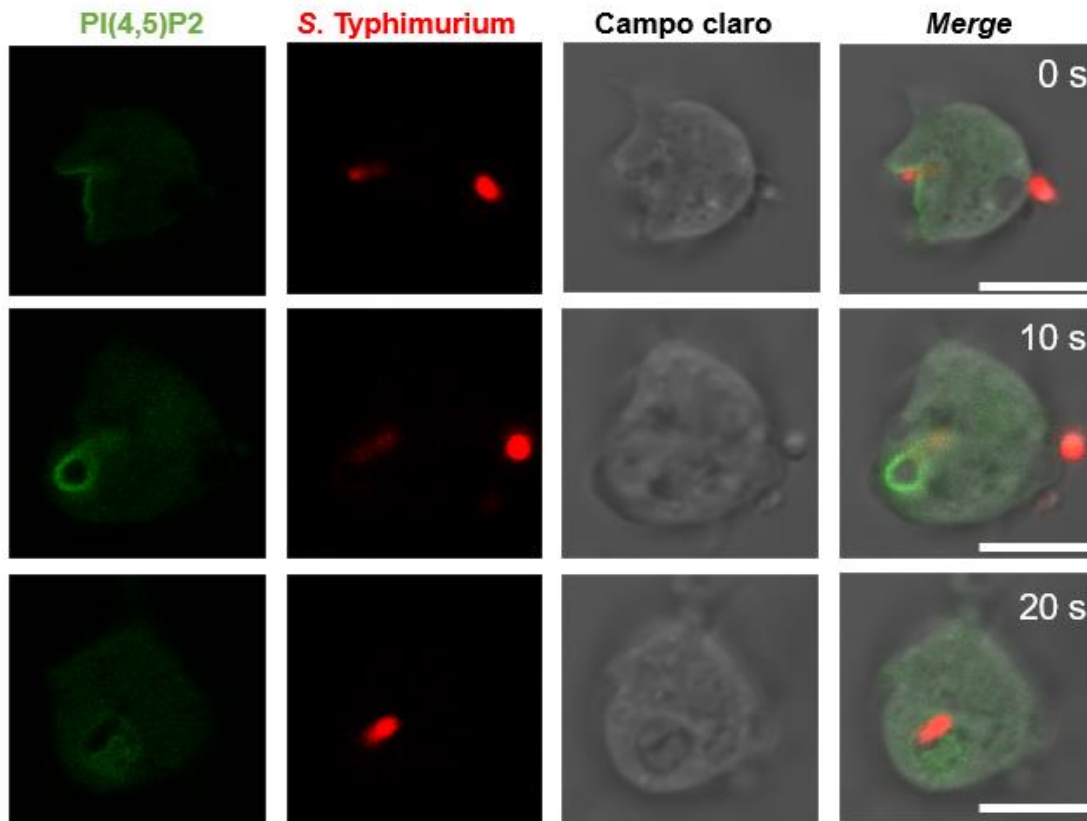
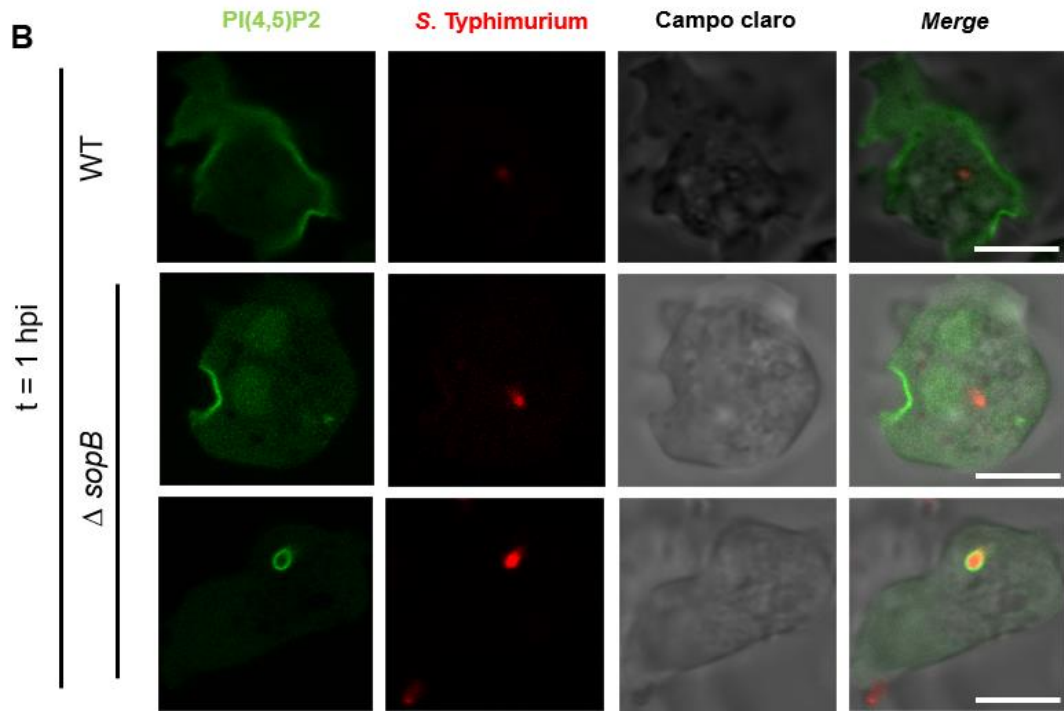
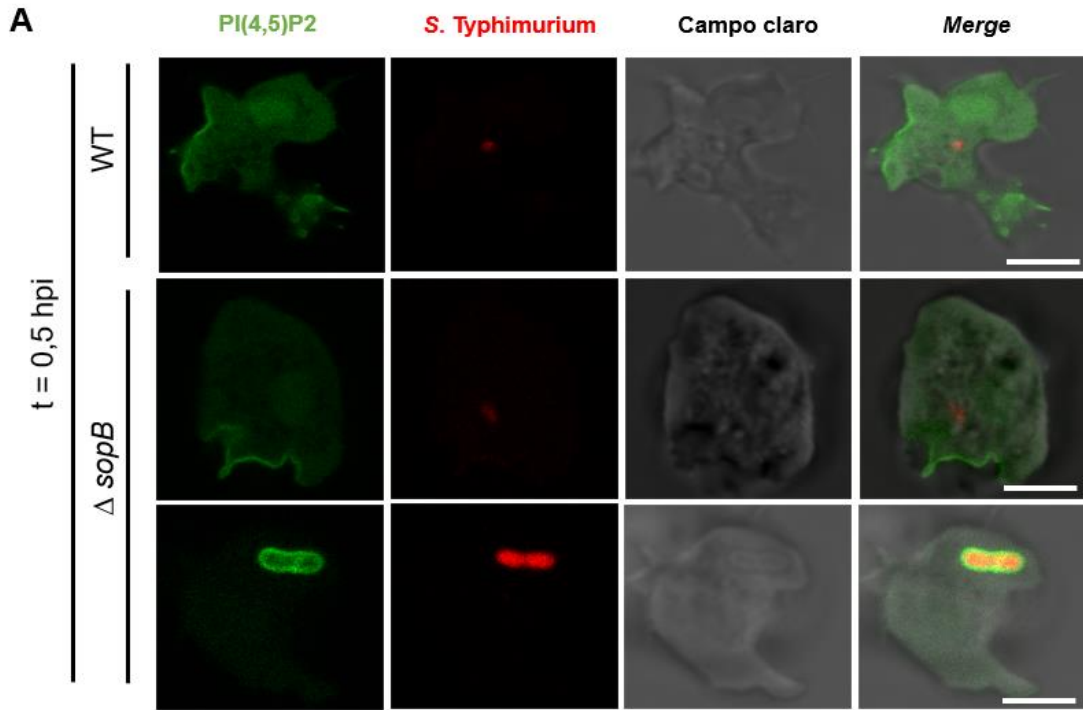


Figura 13. El PI(4,5)P2 cambia su distribución en *D. discoideum* frente a una infección con *S. Typhimurium*. Se utilizó una mutante $\Delta sopB$ de *S. Typhimurium* que expresa constitutivamente mCherry para infectar la cepa *D. discoideum* AX4/pPH-PLC δ 1-GFP. Posteriormente, se obtuvo imágenes utilizando un microscopio confocal Zeiss modelo LSM 700 equipado con un objetivo 100x. Se obtuvieron imágenes cada 10 s desde el momento de la inoculación por al menos 1 h. Barra = 5 μ m.

Para determinar si SopB participa en el cambio de la distribución del fosfoinosítido PI(4,5)P2 en las estructuras membranosas donde reside *S. Typhimurium* en la ameba, se realizaron ensayos de infección de *D. discoideum* AX4/pPH-PLC δ 1-GFP con la cepa silvestre y la mutante $\Delta sopB$ de *S. Typhimurium*. Cada infección se observó mediante microscopía confocal a 0,5 y 1 hpi y se determinó el porcentaje de bacterias que se encontraban rodeadas de estructuras PI(4,5)P2⁺, analizándose al menos 10 amebas infectadas por cada condición. Los resultados muestran que casi todas las bacterias analizadas (tanto la cepa silvestre como la mutante $\Delta sopB$)

no se encuentran rodeadas por estructuras membranosas que retengan el fosfoinositido PI(4,5)P2 a 0,5 y 1 hpi (**Figuras 14A y 14B**, respectivamente). Estos datos se cuantificaron en ambas condiciones y demuestran que el porcentaje de bacterias rodeadas por estructuras PI(4,5)P2⁺ no es significativamente distinto entre la cepa silvestre y la mutante $\Delta sopB$ a 0,5 y 1 hpi (**Figura 14C**). Es importante destacar que en el caso de la mutante $\Delta sopB$, tanto a 0,5 como a 1 hpi se realizó solo una observación donde la bacteria se encontraba rodeada por una estructura PI(4,5)P2⁺ (**Figuras 14A y 14B**, paneles inferiores).



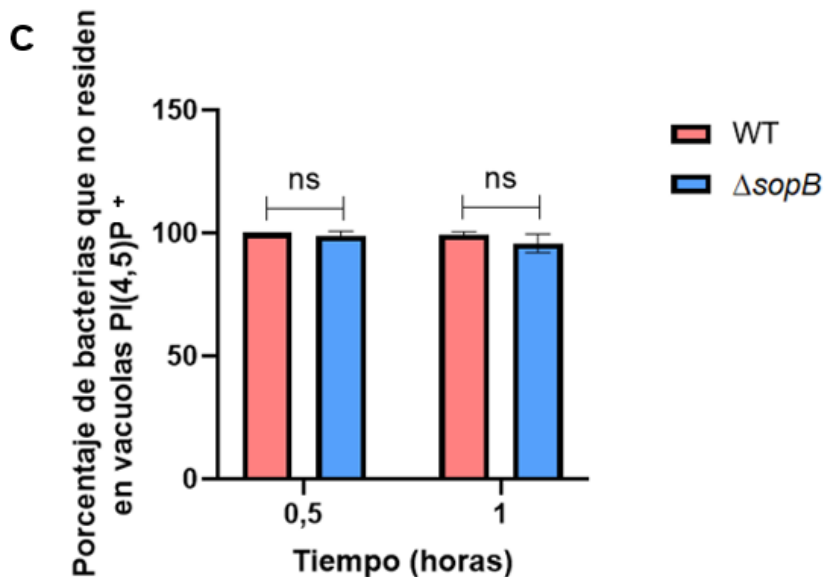


Figura 14. El efector SopB no contribuye a modificar la distribución del PI(4,5)P2 en la SCV de *D. discoideum* a 0,5 y 1 hpi. Se utilizó *S. Typhimurium* silvestre (WT) o Δ sopB que expresan constitutivamente mCherry para infectar la cepa *D. discoideum* AX4/pPH-PLC δ 1-GFP. Posteriormente, se obtuvieron imágenes utilizando un microscopio confocal Zeiss modelo LSM 700 equipado con un objetivo 100x. Se muestran imágenes representativas obtenidas a 0,5 (A) y 1 hpi (B). Las flechas rojas indican bacterias que retienen el PI(4,5)P2 en las membranas que las rodean y las flechas blancas indican bacterias que no lo retienen. Se observa que el porcentaje de bacterias que no retiene el PI(4,5)P2 es predominante a 0,5 y 1 hpi. (C) Se identificaron al menos 10 amebas infectadas con cada cepa analizada y se calculó el porcentaje de bacterias que se encuentran rodeadas de PI(4,5)P2. Las barras de cada gráfico corresponden al promedio de 3 réplicas biológicas \pm SEM. La significancia estadística se determinó usando un ANOVA de 2 vías y el test de comparaciones múltiples de Šídák (ns = no significativo). Barra = 5 μ m.

7. DISCUSIÓN

Salmonella es una bacteria de sumo interés a nivel de salud pública, debido a que es un patógeno que puede estar presente en diversos alimentos de consumo habitual. Debido a esto, se ha profundizado en los mecanismos que utiliza este microorganismo para infectar células de mamíferos. Sin embargo, *Salmonella* también infecta otro tipo de células fagocíticas, como amebas. Éstas son fagocitos profesionales que se encuentran presentes en el medio ambiente y actúan como vectores de transmisión de esta bacteria, lo que presenta un nuevo escenario de interés. Aun así, la información en cuanto a su comportamiento al enfrentarse a estas células en el ambiente es escasa. Considerando esto, en esta tesis se buscó profundizar acerca de los mecanismos que utiliza *S. Typhimurium* para interactuar con amebas, como lo es *D. discoideum*. Específicamente, quisimos evaluar el rol que cumple el efector SopB en el proceso de la evasión de la degradación lisosomal y a su vez en la maduración del compartimento vacuolar en el que reside la bacteria en esta ameba.

7.1 Participación de SopB en la evasión de la ruta de degradación lisosomal en *D. discoideum*

SopB es una proteína efectora de *S. Typhimurium* que participa de la evasión de la degradación lisosomal en modelos celulares eucariontes, como por ejemplo en células epiteliales Henle-407 (Bakowski et al., 2010). Por esto, se propuso determinar si SopB cumple una función similar en *D. discoideum*. Para estudiar este proceso, se realizaron ensayos de infección usando la cepa silvestre y la mutante Δ sopB de *S. Typhimurium*, ambas transformadas con el plasmidio pFCcGi (que permite la expresión constitutiva de mCherry), y la cepa AX4 de *D. discoideum* en presencia del reactivo *Lysotracker Green* para marcar sus lisosomas. Se decidió usar este reactivo debido a que previamente había sido utilizado por otro grupo para estudiar el proceso de autofagia en la misma cepa de *Dictyostelium*, teniendo éxito en la marcación de este organelo (Xiong et al., 2018). Este procedimiento no se había empleado anteriormente en nuestro laboratorio, por lo que requirió la

estandarización del mismo. Entre otros parámetros, debió determinarse la concentración del reactivo a utilizar y el tiempo de incubación. Adicionalmente, debió determinarse si existía algún requerimiento adicional, como el uso del medio LoFlo (Formedium) que disminuye el ruido de fondo en la imagen a capturar mediante microscopía confocal. Finalmente, se optó por utilizar el reactivo *Lysotracker Green* a una concentración de 1 μM e incubarlo por 30 min previo a la captura de imágenes, lo cual permitió observar los límites del organelo mucho más definidos, donde no se observaban halos difusos alrededor de los lisosomas (**Figura 8**).

Cada infección se observó mediante microscopía confocal a 0,5 y 1 hpi y se determinó el porcentaje de bacterias que colocalizan con lisosomas. Los resultados muestran que el porcentaje de bacterias intracelulares que colocalizan con lisosomas es significativamente mayor en las infecciones realizadas con la mutante ΔsopB en comparación con la cepa silvestre a 0,5 y 1 hpi (**Figura 9**). El fenotipo asociado a la mutante ΔsopB concuerda con lo reportado en la literatura para células epiteliales y macrófagos (Bakowski et al., 2010; Oh et al., 1996). En cuanto a la temporalidad de los eventos, en células epiteliales se observa la evasión de la fusión de la SCV con los lisosomas a 1 hpi y no a 0,5 hpi (Bakowski et al., 2010). Sin embargo, en macrófagos este proceso sí se observa a 0,5 hpi (Oh et al., 1996). En el caso de esta tesis, el fenotipo descrito se observó a ambos tiempos de infección. Esto podría deberse a que el tiempo de acción SopB en *D. discoideum* se asemeja más a lo observado en macrófagos, al ser ambas células fagocíticas. Además, SopB es un efector que actúa tanto de forma temprana como tardía durante la infección de células de mamíferos (Ramos Morales, 2012), por lo que los resultados obtenidos tienen sentido para los tiempos de infección evaluados en esta tesis. Esta función de SopB de evitar la fusión de la SCV con lisosomas puede explicarse por la suma de mecanismos atribuibles a este efector que se han descrito en células de mamíferos. Se ha demostrado que SopB cambia la carga neta de la membrana haciéndola menos negativa (Terebiznik et al., 2002), lo que produce un cambio en la destinación de algunas proteínas desde o hacia la SCV. De esta forma, las proteínas Rab8B, Rab13, Rab23 y Rab35 son excluidas de la SCV ya que tienen un dominio policatiónico (Bakowski et al., 2010). Además, Rab23 y Rab35 promueven

la fusión del fagosoma con los lisosomas en células epiteliales (Smith et al., 2007), por lo que tiene sentido que al no estar presentes en la SCV en la cepa silvestre, no se produzca fusión con estos organelos. Adicionalmente, para este resultado se realizó un análisis de Manders (de rojo sobre verde y de verde sobre rojo), que permitió determinar matemáticamente el porcentaje de colocalización entre los lisosomas (fluorescencia verde) y las bacterias intracelulares (fluorescencia roja). El coeficiente de Manders de verde sobre rojo se define como la razón entre las "intensidades sumadas de los píxeles de la imagen verde cuya intensidad en el canal rojo es superior a cero" y la "intensidad total en el canal verde", y viceversa para el coeficiente de rojo sobre verde (Manders et al., 1992). En nuestro caso, se determinó que ambos coeficientes eran mucho mayores para la mutante $\Delta sopB$ que para la cepa silvestre, a ambos tiempos de infección (**Figuras 9C y 9D**). Esto demuestra que el porcentaje de colocalización de las estructuras, calculado matemáticamente es mayor en la mutante $\Delta sopB$ que en la cepa silvestre, lo cual concuerda con lo planteado anteriormente (**Figuras 9A y 9B**). Además, es novedoso con respecto a otros artículos en que se describe el fenómeno (Bakowski et al., 2010; Herrada et al., 2007) pues no suelen mostrar este tipo de cuantificaciones, lo que fortalece el resultado obtenido en esta tesis.

7.2 Participación del efector SopB en la composición lipídica de la SCV en *D. discoideum*

SopB se encuentra descrito en la literatura como un efector que posee actividad fosfatidilinositol fosfatasa (Norris et al., 1998), que hidroliza el fosfoinositido PI(4,5)P₂ presente en la membrana plasmática. Esto promueve la fisión de dicha membrana, facilitando el proceso de invasión. Además, se ha demostrado que frente a la delección del gen que codifica este efector, *S. Typhimurium* se rodea de este fosfoinositido, a diferencia de lo que se observa en la cepa silvestre (Terebiznik et al., 2002). La disminución de PI(4,5)P₂ en la membrana plasmática hace que se reduzca la carga neta negativa que posee, como se indicó en la sección anterior. Esto hace que se excluyan o se recluten distintas proteínas a la membrana de la SCV. Una de las proteínas atraídas a la SCV gracias a la acción de SopB es Rab5,

la cual a su vez recluta directamente a Vps34 uniéndose a ella. Vps34 es una PI(3) quinasa que genera una acumulación de PI(3)P en la SCV (Mallo et al., 2008). Esto sugiere que SopB contribuye a aumentar este fosfoinositido en la membrana de la SCV en células epiteliales.

Para analizar si la proteína efectora SopB tiene un efecto sobre la distribución de fosfoinositidos en *D. discoideum*, se requirió optimizar algún protocolo que permitiera determinar cómo cambian estos lípidos de membrana durante la interacción de la ameba con las bacterias. Para ello, se propuso obtener cepas transformantes de *D. discoideum* que portaran plasmidios que codifiquen sondas que permitan detectar estos fosfoinositidos *in vivo*. Cada sonda se expresa de forma constitutiva y corresponde un dominio de alguna proteína que reconoce y se une específicamente a dicho fosfoinositido en un contexto fisiológico (i.e., el dominio FYVE de EEA1 para PI(3)P y el dominio PH de la Fosfolipasa C para PI(4,5)P2 (Lemmon, 2008; Várnai et al., 2006, Weber et al., 2014)) fusionado al reportero fluorescente GFP. De esta forma, el cambio en la distribución de cada fosfoinositido se podría seguir mediante microscopía confocal. Las cepas transformantes de *D. discoideum* se observaron mediante epifluorescencia, lo que permitió confirmar que el protocolo de transformación se implementó de forma correcta (**Figura 10**). Al igual que en el estudio realizado por Weber (2014), las cepas transformantes generadas en este trabajo expresan sondas que reconocen las mismas estructuras: la sonda que reconoce PI(3)P se asocia a endosomas tempranos, mientras que la sonda asociada a PI(4,5)P2 reconoce la membrana plasmática. Por otro lado, las imágenes de microscopía confocal confirmaron que ambas sondas marcaban las estructuras a las que se asocian estos fosfoinositidos y para lo cual fueron diseñadas y utilizadas previamente en *D. discoideum* (Weber et al., 2014) (**Figura 11**). Estas estructuras también son decoradas por los mismos fosfoinositidos en otras células eucariontes (Hasegawa et al., 2017).

Las tecnologías disponibles para manipular genéticamente a *Dictyostelium* se encuentran bien caracterizadas. Dentro de éstas, la transformación mediada por plasmidios es una de las más utilizadas para estudiar la función de genes en este

organismo modelo (Gaudet et al., 2007). Sin embargo, es importante destacar que el protocolo de transformación de *D. discoideum* con DNA plasmidial no se había implementado antes en nuestro laboratorio, por lo que requirió de su estandarización. Para ello, se utilizó como base el protocolo utilizado en el laboratorio del Dr. Hubert Hilbi (Weber et al., 2014) en el que ya se habían obtenido cepas transformantes en este organismo modelo y donde se construyeron los plasmidios utilizados en esta tesis. Finalmente, se determinó que para una transformación exitosa se requería un trabajo de al menos 1 mes, de un electroporador con un extensor de capacitancia y ser preciso con la cantidad de DNA plasmidial que se añade a la mezcla a electroporar. Esto último fue de vital importancia en el proceso, ya que para el plasmidio pPH-PLC δ 1-GFP utilizar menos de 50 μ g de DNA por mL de suspensión celular no permitía obtener amebas transformantes. Este organismo es muy particular ya que requiere de las señales de células vecinas para múltiples procesos durante su ciclo de vida, como por ejemplo durante el ciclo de desarrollo social (Chisholm & Firtel, 2004). De hecho, se ha documentado que se requiere un alto número de células en las transformaciones de *Dictyostelium* para que las células que sobreviven luego de aplicarse la diferencia de voltaje logren crecer adheridas a las placas formando microcolonias (Gaudet et al., 2007). Por otra parte, es importante destacar el efecto que tienen las distintas sustancias utilizadas para la selección sobre el número de copias obtenidas del plasmidio. Aquellos que contienen el gen que codifica la neomicina fosfotransferasa, que confiere resistencia a G418, poseen una correlación positiva en cuanto a la cantidad de la sustancia con la que se realiza la selección y el número de copias del plasmidio presente en las células transformadas. Además, el número de copias del plasmidio también está correlacionado positivamente con el nivel de expresión del gen de resistencia (Pang et al., 1999; Gaudet et al., 2007). En el caso de los plasmidios utilizados en esta tesis, se observó que pHK95 tuvo una eficiencia de transformación mayor que pPH-PLC δ 1-GFP, por tanto se presentan dos alternativas para mejorar la eficiencia de transformación con el segundo vector: evaluar los niveles de expresión del gen de resistencia a G418 o aumentar la concentración de G418 para el protocolo de transformación con ese vector en

particular. De hecho, las concentraciones de G418 utilizadas generalmente pueden ir desde los 5 a los 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Gaudet et al., 2007). En este estudio se usó una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo que sugiere que se puede aumentar aún más. Sin embargo, aumentar la concentración de la sustancia utilizada para realizar la selección debe realizarse siempre cuidando que la viabilidad celular no se vea afectada. Una forma bastante eficiente para monitorear la viabilidad celular de *D. discoideum* es observar su morfología en un microscopio óptico, pues ésta cambia rápidamente frente a un agente estresor. A esto se suma el conteo de células viables con azul de Tripán (Stoddart, 2011).

Una vez obtenidas las cepas transformantes de *D. discoideum*, se decidió comenzar con los experimentos relacionados con el estudio de la distribución del fosfoinosítido PI(3)P. Para estudiar el efecto de SopB sobre la distribución de este fosfoinosítido, se realizaron ensayos de infección usando la cepa silvestre y la mutante ΔsopB de *S. Typhimurium* (ambas transformadas con el plasmidio pFCcGi que permite la expresión constitutiva de mCherry) y *D. discoideum* AX4/pHK95. Cada infección se observó mediante microscopía confocal a 0,5, 1 y 2 hpi, luego de lo cual se determinó el porcentaje de bacterias que se encontraban en estructuras PI(3)P⁺. Los resultados muestran que frente a la presencia de SopB existe una proporción aumentada de bacterias que residen dentro de vacuolas PI(3)P⁺ a 0,5 hpi. Sin embargo, esta proteína no tendría un efecto a 1 y 2 hpi ya que existe una proporción similar entre bacterias que residen dentro y fuera de vacuolas PI(3)P⁺ para la cepa silvestre y la mutante ΔsopB (**Figura 12D**). El resultado concuerda parcialmente con lo esperado de acuerdo a experimentos realizados en células de mamíferos (Mallo et al., 2008), donde frente a la presencia de SopB se observan bacterias dentro de vacuolas PI(3)P⁺ alrededor de 15 min post infección, que pueden ser observadas hasta 1 hpi. Es decir, se describe como un evento temprano en la infección y por tanto en el desarrollo y maduración de la SCV. Por esto, tiene sentido no observar un porcentaje predominante de bacterias en vacuolas PI(3)P⁺ en amebas a 2 hpi. Aún más, en la revisión presentada por Ramos-Morales (2012), la aparición de PI(3)P en la SCV también está catalogado como un evento que puede ocurrir entre 0 y 1 hpi. Sin embargo, en *D. discoideum* no se observan predominantemente

bacterias asociadas a vacuolas PI(3)P⁺ a 1 hpi, como en otros modelos. Esto puede deberse a que el tiempo de acción de SopB en *D. discoideum* puede que no coincida con lo descrito en otros modelos de células eucariontes. Sin embargo, se observó el fenómeno a tiempos tempranos (0,5 hpi). Se podría hipotetizar que posterior a 0,5 hpi SopB ya no recluta activamente PI(3) quinasas a la SCV en *D. discoideum*, ya que este cambio en la naturaleza lipídica de dicho compartimento le fue útil para reclutar otras proteínas y formar filamentos de naturaleza similar a los filamentos SNX1. Estos últimos son actores importantes en la maduración y posicionamiento de la SCV en células de mamíferos, lo cual ocurre posterior al cambio en la distribución de fosfoinosítidos y se extiende hacia tiempos intermedios de infección (Bujny et al., 2008). Por esto, no tendría sentido que el PI(3)P se siguiera reclutando a la membrana de la SCV en *D. discoideum*. Así mismo, debe tenerse en cuenta que el fosfoinosítido PI(3)P está involucrado en el tráfico vesicular asociado a procesos fisiológicos en *D. discoideum*, por lo tanto puede ocurrir que PI(3) quinasas se movilicen hacia otro destino al interior de la célula, ya que éstas son reclutadas al ocurrir procesos relacionados por ejemplo a quimiotaxia (Postma et al., 2004) o macropinocitosis (Doormann et al., 2004).

Para estudiar el efecto de SopB sobre la distribución del fosfoinosítido PI(4,5)P₂, se realizaron ensayos de infección usando la cepa silvestre y la mutante Δ sopB de *S. Typhimurium* (ambas transformadas con el plasmidio pFCcGi que permite la expresión constitutiva de mCherry) y *D. discoideum* AX4/pPH-PLC δ 1-GFP. Cada infección se observó mediante microscopía confocal a 0,5 y 1 hpi, luego de lo cual se determinó el porcentaje de bacterias que estuvieran rodeadas por estructuras membranosas que retuvieran PI(4,5)P₂. Los resultados muestran que casi la totalidad de las bacterias analizadas no se encuentra rodeada por estructuras PI(4,5)P₂⁺ a 0,5 y 1 hpi, tanto para la cepa silvestre como para la mutante Δ sopB (**Figura 14**). Además de esto, se realizó una observación en tiempo real de cada infección mediante microscopía confocal, capturándose imágenes cada 10 s por al menos 1 h. Se realizó una observación en la cual la mutante Δ sopB es internalizada, concentrando una marca intensa a los 10 s, la cual disminuyó pasados otros 10 s (**Figura 13**). Este resultado indica que el fosfoinosítido PI(4,5)P₂ es redistribuido al

ocurrir la infección de *D. discoideum* con *S. Typhimurium*. Este conjunto de resultados para el fosfoinosítido PI(4,5)P2 concuerda con lo esperado, ya que es un lípido que se localiza en la membrana plasmática, por lo que tiene sentido no observarlo en vesículas intracelulares donde las bacterias ya se han establecido (0,5 y 1 hpi). Sin embargo, se sabe que PI(4,5)P2 se encuentra presente en las invaginaciones de membrana al ocurrir procesos de fagocitosis y macropinocitosis, donde es transformado a otro tipo de fosfoinosítidos, lo cual se ha estudiado en *D. discoideum* (Cardelli et al., 2001). Esto podría explicar por qué se obtuvo una única observación donde PI(4,5)P2 se encontraba rodeando a la mutante $\Delta sopB$ a 0,5 y 1 hpi. De hecho, lo observado podría corresponder a una infección que ocurrió segundos antes de la observación en el microscopio y no al inicio del tiempo evaluado (0,5 o 1 hpi), ya que no todas las amebas son infectadas al mismo tiempo. El hallazgo de que la membrana que rodea a *S. Typhimurium* durante su internalización posea en los primeros segundos la marca fluorescente correspondiente a PI(4,5)P2 y luego ésta se pierda, nos confirma que la distribución este fosfoinosítido cambia durante la infección. Para poder confirmar lo discutido anteriormente, se debe lograr esta misma observación con la cepa silvestre de *S. Typhimurium*. Esto nos permitiría indagar más acerca de la importancia de SopB en la distribución de este fosfoinosítidos a tiempos muy tempranos de infección, de forma tal de evaluar si la desaparición de PI(4,5)P2 ocurre más rápido al estar presente SopB, o si la temporalidad de los eventos es la misma.

Los experimentos realizados durante esta tesis para evaluar la dinámica de fosfoinosítidos demuestran que el uso de microscopía en células que expresan dominios de proteínas fusionados a GFP que se unen a lípidos específicos, es un acercamiento útil e importante para determinar cambios en los niveles de estos lípidos en compartimentos celulares específicos y con una temporalidad definida.

Finalmente, los resultados obtenidos indican que SopB juega un rol importante en la maduración de la SCV en *D. discoideum* a partir de la modificación de la distribución de los lípidos de membrana y su participación en la evasión de la degradación bacteriana por la vía lisosomal, lo cual coincide con lo observado en

células de mamíferos (**Figura 15**). A futuro, es necesario realizar estos experimentos con la cepa mutante $\Delta sopB$ complementada en *trans* para comprobar que se restauran los fenotipos observados. Esto confirmaría que SopB contribuye a los fenotipos que se observaron.

En consecuencia, los resultados presentados este trabajo permiten profundizar en la caracterización de los mecanismos moleculares por los que actúa SopB en *S. Typhimurium*. Es importante destacar que el conocimiento más detallado de la interacción de *S. Typhimurium* con amebas es crucial para comprender el ciclo de vida de *Salmonella* en el medio ambiente. La importancia de este conocimiento radica en la posibilidad de desarrollar estrategias de control de las infecciones causadas por *Salmonella*, al intervenir a nivel de los organismos donde reside la bacteria y que actúan como reservorios ambientales y vectores de transmisión.

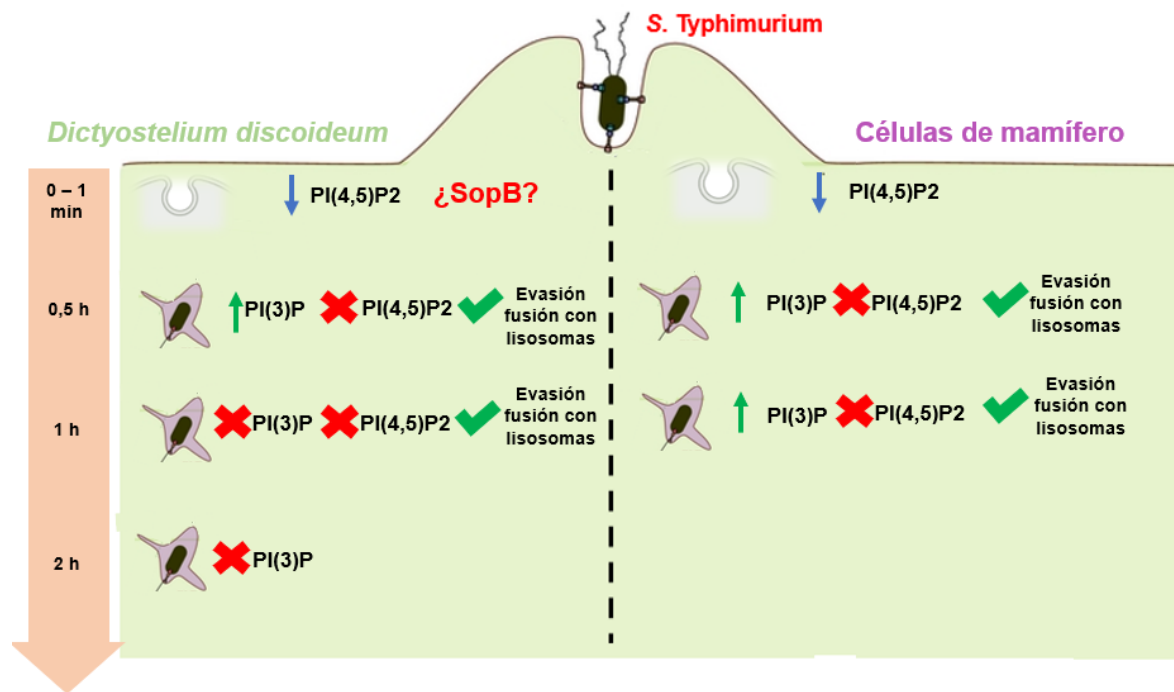


Figura 15. Modelo de la modificación de la vía endocítica en *D. discoideum* frente a la infección con *S. Typhimurium* y su comparación con células de mamíferos.

8. CONCLUSIONES

- I. El efector SopB participa en el proceso de evasión de la fusión de la SCV con los lisosomas de *D. discoideum* a 0,5 y 1 hpi.
- II. El efector SopB participa en la modificación de la distribución de PI(3)P en la membrana de la SCV en *D. discoideum* a 0,5 y 1 hpi.
- III. El fosfoinosítido PI(4,5)P₂ se asocia transitoriamente a la membrana de la SCV naciente en los primeros segundos de la interacción entre *D. discoideum* y *S. Typhimurium*; sin embargo, se desconoce si SopB participa en este proceso. Por otra parte, a 0,5 y 1 hpi PI(4,5)P₂ no se asocia a la membrana de la SCV en *D. discoideum*.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Bakowski, M. A.**, Braun, V., Lam, G. Y., Yeung, T., Heo, W. D., Meyer, T., Finlay, B. B., Grinstein, S. & Brumell, J. H. (2010). The phosphoinositide phosphatase SopB manipulates membrane surface charge and trafficking of the *Salmonella* containing vacuole. *Cell Host and Microbe* **7**(6):453-462.
- Bleasdale, B.**, Lott, P. J., Jagannathan, A., Stevens, M. P., Birtles, R. J. & 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. *Applied and Environmental Microbiology* **75**(6):1793-1795.
- Bozzaro, S.** & Eichinger, L. (2011). The professional phagocyte *Dictyostelium discoideum* as a model host for bacterial pathogens. *Current Drug Targets* **12**(7):942-954.
- Bozzaro, S.**, Buracco, S., Peracino, B. & Eichinger, L. (2019). *Dictyostelium* host response to *Legionella* infection: Strategies and assays. In: *Legionella*, pp. 347-370. *Humana Press*.
- Brandl, M. T.**, Rosenthal, B. M., Haxo, A. F. & Berk, S. G. (2005). Enhanced survival of *Salmonella enterica* in vesicles released by a soilborne *Tetrahymena* species. *Applied and Environmental Microbiology* **71**(3):1562-1569.
- Braun, V.**, Wong, A., Landekic, M., Hong, W. J., Grinstein, S. & Brumell, J. H. (2010). Sorting nexin 3 (SNX3) is a component of a tubular endosomal network induced by *Salmonella* and involved in maturation of the *Salmonella*-containing vacuole. *Cellular Microbiology* **12**(9):1352-1367.
- Brenner, F. W.**, Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R. & Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* nomenclature – Guest commentary. *Journal of Clinical Microbiology* **38**(7):2465-2467.
- Bruno, V. M.**, Hannemann, S., Lara-Tejero, M., Flavell, R. A., Kleinstein, S. H. & Galan, J. E. (2009). *Salmonella* Typhimurium type III secretion effectors stimulate innate immune responses in cultured epithelial cells. *PLoS Pathogens* **5**(8):e1000538.
- Bujny, M. V.**, Ewels, P. A., Humphrey, S., Attar, N., Jepson, M. A. & Cullen, P. J. (2008). Sorting nexin-1 defines an early phase of *Salmonella*-containing vacuole-remodeling during *Salmonella* infection. *Journal of Cell Science* **121**(Pt 12):2027-2036.

- Chisholm, R. L.** & Firtel, R. A. (2004). Insights into morphogenesis from a simple developmental system. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology* **5**(7):531.
- Cirillo, D. M.**, Valdivia, R. H., Monack, D. M. & 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.
- Coburn, B.**, Grassl, G. A. & Finlay, B. B. (2007). *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunology and Cell Biology* **85**(2):112-118.
- Creasey, E. A.** & Isberg, R. R. (2014). Maintenance of vacuole integrity by bacterial pathogens. *Current Opinion in Microbiology* **17**:46-52.
- Datsenko, K. A.** & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **97**(12):6640-6645.
- Desai, P. T.**, Porwollik, S., Long, F., Cheng, P., Wollam, A., Bhonagiri-Palsikar, V., Hallsworth-Pepin, K., Clifton, S. W., Weinstock, G. M. & McClelland, M. (2013). Evolutionary genomics of *Salmonella enterica* subspecies. *mBio* **4**(2):e00579-12.
- Dormann, D.**, Weijer, G., Dowler, S. & Weijer, C. J. (2004). In vivo analysis of 3-phosphoinositide dynamics during *Dictyostelium* phagocytosis and chemotaxis. *Journal of Cell Science* **117**(26):6497-6509.
- Drecktrah, D.**, Levine-Wilkinson, S., Dam, T., Winfree, S., Knodler, L. A., Schroer, T. A. & Steele-Mortimer, O. (2008). Dynamic behavior of *Salmonella*-induced membrane tubules in epithelial cells. *Traffic* **9**(12):2117-2129.
- Duhon, D.** & Cardelli, J. (2002). The regulation of phagosome maturation in *Dictyostelium*. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* **23**(7-8):803-808.
- Eichinger, L.** (2003). Revamp a model-status and prospects of the *Dictyostelium* genome project. *Current Genetics* **44**(2):59-72.
- Enninga, J.**, Mounier, J., Sansonetti, P. & Van Nhieu, G. T. (2005). Secretion of type III effectors into host cells in real time. *Nature Methods* **2**(12):959-965.

- Feasey, N. A.**, Dougan, G., Kingsley, R. A., Heyderman, R. S. & Gordon, M. A. (2012). Invasive non-typhoidal *Salmonella* disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. *Lancet* **379**(9835):2489-2499.
- Feng, Y.**, Hsiao, Y. H., Chen, H. L., Chu, C., Tang, P. & Chiu, C. H. (2009). Apoptosis-like cell death induced by *Salmonella* in *Acanthamoeba rhysodes*. *Genomics* **94**(2):132-137.
- Fey, P.**, Dodson, R. J., Basu, S. & Chisholm, R. L. (2013). One stop shop for everything *Dictyostelium*: dictyBase and the Dicty Stock Center in 2012. *Methods in Molecular Biology* **983**:59-92.
- Figueira, R.**, Watson, K. G., Holden, D. W. & 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.** & 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 Microbiology Letters* **362**(10):fnv067.
- Freeman, J. A.**, Rappl, C., Kuhle, V., Hensel, M., & Miller, S. I. (2002). SpiC is required for translocation of *Salmonella* pathogenicity island 2 effectors and secretion of translocon proteins SseB and SseC. *Journal of bacteriology*, **184**(18), 4971-4980.
- Fu, Y.** & Galán, J. E. (1999). A *Salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature* **401**(6750), 293-297.
- Galán, J. E.** & Curtiss, R. 3rd (1989). Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **86**(16):6383-6387.
- Galán, J. E.**, Ginocchio, C. & Costeas, P. (1992). Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of InvA to members of a new protein family. *Journal of Bacteriology* **174**(13):4338-4349.
- Gao, L. Y.**, Harb, O. S. & Abu Kwaik, Y. (1997). Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa. *Infection and Immunity* **65**(11):4738-4746.

- Garcia-del Portillo, F.** & Finlay, B. B. (1995). Targeting of *Salmonella typhimurium* to vesicles containing lysosomal membrane glycoproteins bypasses compartments with mannose 6-phosphate receptors. *The Journal of Cell Biology* **129**(1):81-97.
- Gaudet, P.**, Pilcher, K. E., Fey, P. & Chisholm, R. L. (2007). Transformation of *Dictyostelium discoideum* with plasmid DNA.
- Gaze, W. H.**, Burroughs, N., Gallagher, M. P. & Wellington E. M. (2003). Interactions between *Salmonella Typhimurium* and *Acanthamoeba polyphaga*, and observation of a new mode of intracellular growth within contractile vacuoles. *Microbial Ecology* **46**(3):358-369.
- Gulig, P. A.** & Doyle, T. J. (1993). The *Salmonella Typhimurium* virulence plasmid increases the growth rate of *Salmonellae* in mice. *Infection and Immunity* **61**(2):504-511.
- Hasegawa, J.**, Strunk, B. S. & Weisman, L. S. (2017). PI5P and PI(3,5)P2: minor, but essential phosphoinositides. *Cell Structure and Function* **42**(1):49-60.
- Haraga, A.**, Ohlson, M. B. & Miller, S. I. (2008). *Salmonellae* interplay with host cells. *Nature Reviews Microbiology* **6**(1):53-66.
- Hardt, W. D.**, Chen, L. M., Schuebel, K. E., Bustelo, X. R. & Galán, 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.
- Hensel, M.**, Shea, J. E., Bäumlner, A. J., Gleeson, C., Blattner, F. & Holden, D. W. (1997). Analysis of the boundaries of *Salmonella* pathogenicity island 2 and the corresponding chromosomal region of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **179**(4):1105-1111.
- Hensel, M.**, Shea, J.E., Gleeson, C., Jones, M. D., Dalton, E. & Holden, D. W. (1995). Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* **269**(5222):400-403.
- Herrada, A. A.**, Contreras, F. J., Tobar, J. A., Pacheco, R., & Kalergis, A. M. (2007). Immune complex-induced enhancement of bacterial antigen presentation requires Fcγ receptor III expression on dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **104**(33):13402-13407.
- Hume, P. J.**, Singh, V., Davidson, A.C. & Koronakis, V. (2017): Swiss army pathogen: *Salmonella* entry toolkit. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **7**:348

- Jia, K.**, Thomas, C., Akbar, M., Sun, Q., Adams-Huet, B., Gilpin, C. & Levine, B. (2009). Autophagy genes protect against *Salmonella typhimurium* infection and mediate insulin signaling-regulated pathogen resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **106**(34):14564-14569.
- Lemmon, M. A.** (2008). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nature reviews Molecular cell biology*, **9**(2), 99-111.
- Mallo, G. V.**, Espina, M., Smith, A. C., Terebiznik, M. R., Alemán, A., Finlay, B. B., Rameh, L. E., Grinstein, S. & Brumell, J. H. (2008). SopB promotes phosphatidylinositol 3-phosphate formation on *Salmonella* vacuoles by recruiting Rab5 and Vps34. *The Journal of Cell Biology* **182**(4):741-752.
- Manders, E.**, Stap, J., Brakenhoff, G., van Driel, R. & Aten, J. (1992). Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *Journal of Cell Science* **103**(Pt 3):857-862.
- Norris, F. A.**, Wilson, M. P., Wallis, T. S., Galyov, E. E. & Majerus, P. W. (1998). SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **95**(24):14057-14059.
- Oh, Y. K.**, Alpuche-Aranda, C., Berthiaume, E., Jinks, T., Miller, S. I. & Swanson J. A. (1996). Rapid and complete fusion of macrophage lysosomes with phagosomes containing *Salmonella typhimurium*. *Infection and Immunity* **64**(9):3877-3883
- Pang, K. M.**, Lynes, M. A. & Knecht, D. A. (1999). Variables controlling the expression level of exogenous genes in *Dictyostelium*. *Plasmid* **41**(3):187-197.
- Patel, J. C.** & Galán, J. E. (2006). Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. *The Journal of Cell Biology* **175**(3):453-463.
- Popoff, M. Y.** (2001). Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 8th edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris, France.
- Popoff, M. Y.**, Bockemühl, J. & Gheesling, L. L. (2004). Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology* **155**(7):568-570.

- Postma, M.**, Roelofs, J., Goedhart, J., Looovers, H. M., Visser, A. J. & Van Haastert, P. J. (2004). Sensitization of *Dictyostelium* chemotaxis by phosphoinositide-3-kinase-mediated self-organizing signalling patches. *Journal of Cell Science* **117**(14):2925-2935.
- Raffatellu, M.**, Chessa, D., Wilson, R. P., Tükel, C., Akçelik, M. & Bäumler, A. J. (2006). Capsule-mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. *Infection and Immunity* **74**(1):19-27.
- Ramos-Morales, F.** (2012). Impact of *Salmonella* enterica Type III Secretion System effectors on the eukaryotic host cell. *International Scholarly Research Notices Cell Biology* **2012**:787934.
- Ramsden, A. E.**, Mota, L. J., Münter, S., Shorte, S. L. & Holden, D. W. (2007). The SPI-2 type III secretion system restricts motility of *Salmonella*-containing vacuoles. *Cellular Microbiology* **9**(10):2517-2529.
- Rappl, C.**, Deiwick, J. & Hensel, M. (2003). Acidic pH is required for the functional assembly of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *FEMS Microbiology Letters* **226**(2):363-372.
- Reh fuss, M. Y.**, Parker, C. T. & Brandl, M. T. (2011). *Salmonella* transcriptional signature in *Tetrahymena* phagosomes and role of acid tolerance in passage through the protist. *The ISME Journal* **5**(2):262-273.
- Riquelme, S.**, Varas, M., Valenzuela, C., Velozo, P., Chahin, N., Aguilera, P., Sabag, A., Labra, B., Álvarez, S. A., Chávez, F. P. & Santiviago, C. A. (2016). Relevant genes linked to virulence are required for *Salmonella* Typhimurium to survive intracellularly in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Frontiers in Microbiology* **7**:1305.
- Rogers, L. D.**, Brown, N. F., Fang, Y., Pelech, S. & Foster, L. J. (2011). Phosphoproteomic analysis of *Salmonella* infected cells identifies key kinase regulators and SopB-dependent host phosphorylation events. *Science Signaling* **4**(191):rs9.
- Rowbotham, T. J.** (1980). Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *Journal of Clinical Pathology* **33**(12):1179-1183.
- Schindelin, J.**, Arganda-Carreras, I., Frise, E. Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J-Y., White, D. J., Hartenstein,

V., Eliceiri, K., Tomancak, P. & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* **9**(7):676-682.

Schroeder, N., Henry, T., de Chastellier, C., Zhao, W., Guilhon, A. A., Gorvel, J. P. & Méresse, S. (2010). The virulence protein SopD2 regulates membrane dynamics of *Salmonella*-containing vacuoles. *PLoS Pathogens* **6**(7):e1001002.

Segal, G. & Shuman, H. A. (1999). *Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages. *Infection and Immunity* **67**(5):2117-2124.

Sillo, A., Matthias, J., Konertz, R., Bozzaro, S. & Eichinger, L. (2011). *Salmonella* Typhimurium is pathogenic for *Dictyostelium* cells and subverts the starvation response. *Cellular Microbiology* **13**(11):1793-1811.

Skriwan, C., Fajardo, M., Hagele, S., Horn, M., Wagner, M., Michel, R., Krohne, G., Schleicher, M., Hacker, J. & Steinert, M. (2002). Various bacterial pathogens and symbionts infect the amoeba *Dictyostelium discoideum*. *International Journal of Medical Microbiology* **291**(8):615-624.

Smith, A. C., Cirulis, J. T., Casanova, J. E., Scidmore, M. A. & Brumell, J. H. (2005). Interaction of the *Salmonella*-containing vacuole with the endocytic recycling system. *Journal of Biological Chemistry* **280**(26):24634-24641.

Smith, A. C., Heo, W. D., Braun, V., Jiang, X., Macrae, C., Casanova, J. E., Scidmore, M. A., Grinstein, S., Meyer, T. & Brumell, J. H. (2007). A network of Rab GTPases controls phagosome maturation and is modulated by *Salmonella* enterica serovar Typhimurium. *Journal of Cell Biology* **176**(3):263-268.

Steele-Mortimer, O. (2008). The *Salmonella*-containing vacuole: moving with the times. *Current Opinion in Microbiology* **11**(1):38-45.

Steele-Mortimer, O., Knodler, L. A., Marcus, S. L., Scheid, M. P., Goh, B., Pfeifer, C. G., Duronio, V. & Finlay, B. B. (2000). Activation of Akt/Protein kinase B in epithelial cells by the *Salmonella typhimurium* effector SigD. *Journal of Biological Chemistry* **275**(48):37718-37724.

- Steele-Mortimer, O.**, Meresse, S., Gorvel, J. P., Toh, B. H. & Finlay, B. B. (1999). Biogenesis of *Salmonella* Typhimurium containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway. *Cellular Microbiology* **1**(1):33-49.
- Steinert, M.** (2011). Pathogen-host interactions in *Dictyostelium*, *Legionella*, *Mycobacterium* and other pathogens. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **22**(1):70-76.
- Stoddart M. J.** (2011) Cell Viability Assays: Introduction. In: Stoddart M. (eds) Mammalian Cell Viability. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 740. Humana Press.
- Terebiznik, M. R.**, Vieira, O. V., Marcus, S. L., Slade, A., Yip, C. M., Trimble, W. S., Meyer, T., Finlay, B. B. & Grinstein, S. (2002). Elimination of host cell PtdIns(4,5)P₂ by bacterial SigD promotes membrane fission during invasion by *Salmonella*. *Nature Cell Biology* **4**(10):766-773.
- Tezcan-Merdol, D.**, Ljungstrom, M., Winiacka-Krusnell, J., Linder, E., Engstrand, L. & Rhen, M. (2004). Uptake and replication of *Salmonella* enterica in *Acanthamoeba rhysodes*. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(6):3706-3714.
- Truong, D.**, Boddy, K. C., Canadien, V., Brabant, D., Fairn, G. D., D'Costa, V. M., Coyaud, E., Raught, B., Pérez-Sala, D., Sun Park, W., Do Heo, W., Grinstein, S. & Brumell, J. H. (2018). *Salmonella* exploits host Rho GTPase signalling pathways through the phosphatase activity of SopB. *Cellular Microbiology* **20**(10): e12938.
- 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*. *Frontiers in Microbiology* **9**:3001.
- Valenzuela, C.**, Gil, M., Urrutia, Í. M., Sabag, A., Enninga, J. & Santiviago, C. A. (2021). SopB- and SifA-dependent shaping of the *Salmonella*-containing vacuole proteome in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Cellular Microbiology* **23**(1):e13263
- Varas, M. A.**, Riquelme-Barrios, S., Valenzuela, C., Marcoleta, A. E., Berríos-Pastén, C., Santiviago, C. A. & Chávez, F. P. (2018). Inorganic polyphosphate is essential for *Salmonella* Typhimurium virulence and survival in *Dictyostelium discoideum*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **8**:8.

- Várnai, P., & Balla, T. (2006).** Live cell imaging of phosphoinositide dynamics with fluorescent protein domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1761**(8), 957-967.
- Waterman, S. R. & Holden, D. W. (2003).** Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cellular Microbiology* **5**(8):501-511.
- Weber, S., Wagner, M. & Hilbi, H. (2014).** Live-cell imaging of phosphoinositide dynamics and membrane architecture during *Legionella* infection. *mBio* **5**(1):e00839-13.
- Wildschutte, H. & Lawrence, J. G. (2007).** Differential *Salmonella* survival against communities of intestinal amoebae. *Microbiology* **153**(6):1781-1789.
- Wildschutte, H., Wolfe, D. M., Tamewitz, A. & Lawrence, J. G. (2004).** Protozoan predation, diversifying selection, and the evolution of antigenic diversity in *Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **101**(29):10644-10649.
- Xiong, Q., Fischer, S., Karow, M., Müller, R., Meling, S. & Eichinger, L. (2018).** ATG16 mediates the autophagic degradation of the 19S proteasomal subunits PSMD1 and PSMD2. *European Journal of Cell Biology*, **97**(8), 523-532.