

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**“Rol de las modificaciones del lipopolisacárido de
Salmonella enterica serovar Typhimurium en la
resistencia a péptidos antimicrobianos y la supervivencia
intracelular en *Dictyostelium discoideum*”**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al Grado Académico
de Magíster en Bioquímica, área de especialización en Bioquímica
Toxicológica y Diagnóstico Molecular y Memoria para optar al Título de
Bioquímica por:**

CAMILA FERNANDA ESPINOZA GREZ

Directores de Tesis

Dr. Sergio A. Álvarez

Dr. Carlos A. Santiviago

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

SANTIAGO - CHILE

2023

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 Magister y Memoria de Título presentada por la candidata:

CAMILA FERNANDA ESPINOZA GREZ

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. Sergio A. Álvarez

Dr. Carlos A. Santiviago

Comisión Informante de Tesis

Dr. Davor Cotoras (Presidente)

Dra. Denisse Bravo

Dr. Edwar Fuentes

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Sergio A. Álvarez y el Dr. Carlos A. Santiviago. El trabajo de tesis contó con financiamiento de los proyectos FONDECYT 1171844 y 1212075.

“Nosotros deberíamos aclararle a la mayoría que el éxito es una excepción, (...). Los seres humanos de vez en cuando triunfan. Pero habitualmente se desarrollan, combaten, se esfuerzan, y ganan de vez en cuando. Muy de vez en cuando...”

Marcelo Bielsa

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia quisiera agradecer al Laboratorio de Microbiología que me acogió desde el año 2018 en mi primera unidad de investigación, sin saber que años más tarde sería el lugar donde realizaría mi tesis.

A mis profesores, Cliff y Sergio, por su infinita paciencia y enseñanzas durante todo el proceso que fue esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio cuando recién llegué, los primeros que me recibieron y me enseñaron lo básico, el Héctor, la Andrea, la Pali, la Kamo, el Jimmy y el Negro. Gracias totales por todos los conocimientos que traspasaron a mi pequeña cabeza y por hacerme amar la microbiología. También por las risas y las tallas (las fomes igual sacaron risas...jaja).

A mis compañeros de laboratorio durante el período de tesis, la Morgan, la Marce, el Feña y la Chinchi. Quiero detarme en el Feña y la Chinchi porque sin ellos esta tesis no hubiera sido posible. Son los que siempre estuvieron acompañándome en esos días eternos de ensayos, los que iban a ver a los bichos cuando yo no podía, incluso cuando era un fin de semana. Sin su apoyo y su alegría contagiosa nada de esto hubiera sido posible. Infinito amor para ustedes por siempre.

También quiero agradecer a aquellos que me ayudaron y lograron que llegara hasta esta instancia, mis compañeros de carrera que me recibieron cuando me atrasé un año, sin esas jornadas maratónicas de estudio creo que nunca hubiera podido pasar los ramos de 4° año en adelante, también por las celebraciones cuando se acababa una semana del terror (nunca te olvidaré semana 9 del semestre otoño 2017) y por todas esas tallas y anécdotas que siempre repetimos cuando nos juntamos. Muchísimas gracias Kako, Nico, Luka, Andrés, Mati, Jorge, Jota, Oscar y Chris, son los mejores compañeros de carrera con los que pude compartir.

Al team Ricoffe, mi segunda casa en la universidad, quienes me adoptaron como una hija/hermana más y fueron quienes me contuvieron en mis peores momentos y también celebraron conmigo en los mejores. Sin su apoyo constante y sus buenas

vibras no creo que hubiera podido pasar de segundo año de la carrera. Muchas gracias tía Paty, tío Richy, Cami, Cota y Feña.

Agradecer también a mis amigos de toda la vida, aquellos que me dio Algarrobo y a mis amigas del colegio, por su apoyo constante y las juntas que me hacían respirar y distraerme de todo lo que estaba pasando en la universidad, por nunca perder la fe en que me iba a titular...jaja. Los quiero mucho Maca, Marcia, Richi, Javier, Joseto, Cony, Cona, Carli, Wale, Frani, Dodi y Cata, son lo más.

Por otro lado, quiero agradecer a mi apoyo de siempre, a mi familia, a mis viejos que fueron pacientes en este largo proceso universitario, que entendían que en semanas de máximo estrés solo necesitaba existir Gracias por siempre estar presentes, incluso cuando era la persona más insoportable; también a mis hermanos, que aunque no cacharan nada igual me soportaban. Gracias a mis abuelos, a mi nona Amanda, mi nona Silvia y mi tata Hernán; mis tíos abuelos como mi tío Carlos y mi tía Marta. Todos ellos formaron parte también de este largo proceso, sobre todo cuando el viaje a Maipú no era opción. Ellos ofrecieron su hogar para poder quedarme y lo hicieron con todo el amor del mundo. Otra familia que gané con el tiempo fue la familia Rifo Puebla, que también siempre me apoyó como pudieron e hicieron que este proceso fuera mucho menos pesado de lo que realmente era. Muchas gracias por todo el cariño y apoyo siempre.

Por último, quiero agradecer a Gonza, mi pilar fundamental sobre todo en esta última parte. Por no dejarme bajar los brazos y animarme cada vez que lo necesité, por tratarme con amor cuando andaba idiota escribiendo, desde el anteproyecto hasta la escritura final de tesis, muchas gracias por tanto.

Todas las personas aquí nombradas tienen un lugar muy importante en mi corazón y sin ellos nada de esto hubiera sido posible. Me demoré un poco en terminar esto, pero finalmente puedo decir:

SÍ SE PUDO BURRO!

PRESENTACIONES EN CONGRESOS INTERNACIONALES

Fernández, P., Velásquez, F., Garcias-Papayani, H., Silva, C. A., Amaya, F., **Espinoza-Grez, C.**, Ortega, J., Santiviago, C. A., Álvarez, S. A. **FNR regulates lipid A modification in *Salmonella* Enteritidis by controlling the expression of genes involved in this process in response to oxygen availability.** XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología, 13 al 16 de Noviembre, 2018, Santiago, Chile.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS NACIONALES

Fernández, P., **Espinoza-Grez, C.**, Avilés, A., Garcias-Papayani, H., Ortega, J., Santiviago, C. A., Álvarez S. A. **La expresión de genes involucrados en la modificación del lípido A de *Salmonella* Enteritidis es regulada directamente por ArcA en respuesta a la disponibilidad de oxígeno.** XLI Congreso Chileno de Microbiología, 5 al 8 de Noviembre, 2019, Hotel Enjoy, Puerto Varas, Chile.

Espinoza-Grez, C., Sabag, A., Labra, B., Álvarez S. A., Santiviago, C. A. **Contribución del lipopolisacárido en la resistencia a péptidos antimicrobianos y supervivencia intracelular de *Salmonella* Typhimurium en la ameba *Dictyostelium discoideum*.** XLIII Congreso Chileno de Microbiología, 30 de Noviembre al 2 de Diciembre, 2021, Santiago, Chile.

Espinoza-Grez, C., Avilés, A., Álvarez, S. A., Santiviago, C.A. **La estructura del lipopolisacárido afecta la supervivencia de *Salmonella* Typhimurium frente a péptidos antimicrobianos de *Dictyostelium discoideum*.** XLIV Congreso Chileno de Microbiología, 29 de Noviembre al 2 de Diciembre, 2022, La Serena, Chile.

ÍNDICE GENERAL

Índice General	VIII
Índice de Tablas y Figuras	X
Abreviaturas	XI
Resumen	XIII
Abstract	XV
1.- Introducción	1
1.1.- Generalidades de <i>Salmonella</i>	1
1.2.- Ciclo infeccioso de <i>Salmonella</i>	1
1.3.- Interacción de <i>Salmonella</i> con protozoos	2
1.4.- <i>Dictyostelium discoideum</i> como organismo modelo para el estudio de la interacción bacteria-hospedero.....	4
1.5.- El lipopolisacárido de <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	5
1.6.- Dinámica estructural del lípido A en <i>S. Typhimurium</i>	7
1.7.- Rol del AgO de <i>S. Typhimurium</i> en la relación patógeno-hospedero	9
1.8.- <i>Dictyostelium discoideum</i> y péptidos con actividad antimicrobiana	10
2.- Hipótesis	13
3.- Objetivo General	14
4.- Objetivos Específicos	14
5.- Materiales y Métodos	15
5.1.- Reactivos	15
5.2.- Cepas bacterianas	16
5.3.- Plasmidios.....	17
5.4.- Partidores.....	17
5.5.- Medios y condiciones de cultivo bacteriano	18
5.6.- Líneas celulares eucariontes y condiciones de cultivo celular	19
5.7.- Construcción de mutantes de <i>S. Typhimurium</i> 14028s por el método <i>Red-swap</i>	20
5.7.1.- Extracción de DNA plasmidial.....	20
5.7.2.- Obtención de productos de PCR para mutagénesis	20
5.7.3.- Preparación de bacterias electrocompetentes y transformación bacteriana	21

5.7.4.- Mutagénesis por intercambio alélico de productos PCR.....	22
5.7.5.- Comprobación de las colonias mutantes por PCR.....	23
5.8.- Transducción de los alelos mutantes en <i>S. Typhimurium</i> 14028s	23
5.8.1.- Preparación de lisados de partículas transductantes.....	24
5.8.2.- Transducción	24
5.8.3.- Comprobación y selección de transductantes.....	25
5.9.- Ensayo de sensibilidad a polimixina B	25
5.10.- Ensayo de infección por competencia en <i>D. discoideum</i>	26
5.11.- Análisis estadísticos y expresión de resultados	28
6.- Resultados.....	29
6.1.- Efecto de la delección de los genes <i>arnBCADTEF</i> , <i>eptA</i> , <i>waaL</i> , <i>lpxO</i> , <i>lpxR</i> y <i>pagP</i> de <i>S. Typhimurium</i> en la suceptibilidad a polimixina B.....	29
6.2.- Contribución de los genes <i>arnBCADTEF</i> , <i>eptA</i> , <i>waaL</i> , <i>lpxO</i> , <i>lpxR</i> y <i>pagP</i> en la supervivencia intracelular de <i>S. Typhimurium</i> en <i>D. discoideum</i>	32
6.3.- Contribución de los genes <i>arnBCADTEF</i> , <i>eptA</i> , <i>waaL</i> , <i>lpxO</i> , <i>lpxR</i> y <i>pagP</i> en la supervivencia intracelular de <i>S. Typhimurium</i> en una cepa de <i>D. discoideum</i> que carece del amebaporo ApID	35
7.- Discusión.....	39
7.1.- Contribución de los genes <i>arnBCADTEF</i> , <i>eptA</i> , <i>waaL</i> , <i>lpxO</i> , <i>lpxR</i> y <i>pagP</i> en la resistencia de <i>S. Typhimurium</i> al péptido antimicrobiano polimixina B.....	41
7.2.- Contribución de los genes <i>arnBCADTEF</i> , <i>eptA</i> , <i>waaL</i> , <i>lpxO</i> , <i>lpxR</i> y <i>pagP</i> en la supervivencia intracelular de <i>S. Typhimurium</i> en una cepa de <i>D. discoideum</i> que carece del amebaporo ApID	43
8.- Conclusiones	49
9.- Bibliografía	50

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en esta tesis	16
Tabla 2. Plasmidios utilizados en esta tesis	17
Tabla 3. Oligonucleótidos partidores utilizados en esta tesis	17
Tabla 4. Líneas celulares eucariontes utilizadas en esta tesis.....	19

FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Salmonella</i>	4
Figura 2. Estructura del lipopolisacárido de <i>S. Typhimurium</i>	6
Figura 3. Estructura y modificación del lípido A de <i>Salmonella</i>	9
Figura 4. Arquitectura molecular de las proteínas precursoras de Apl	12
Figura 5. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la susceptibilidad de <i>S. Typhimurium</i> a polimixina B	30
Figura 6. Supervivencia de la cepa WT y las cepas mutantes de <i>S. Typhimurium</i> en estudio frente a polimixina B	31
Figura 7. Ensayos de infección por competencia <i>in vitro</i> entre la cepa WT y las cepas mutantes de <i>S. Typhimurium</i> en <i>D. discoideum</i> AX2.....	33
Figura 8. Internalización de las cepas de <i>S. Typhimurium</i> en estudio en <i>D. discoideum</i> AX2.....	34
Figura 9. Ensayos de infección por competencia <i>in vitro</i> entre la cepa WT y las cepas mutantes de <i>S. Typhimurium</i> en <i>D. discoideum</i> AX2 y AX2 ApID ⁻	36
Figura 10. Internalización de las cepas de <i>S. Typhimurium</i> en estudio en <i>D. discoideum</i> AX2 ApID ⁻	37

ABREVIATURAS

AgO	:	Antígeno O
Amp	:	Ampicilina
Amp ^R	:	Resistencia a ampicilina
AMPs	:	Péptidos antimicrobianos
Apl	:	Péptido tipo amebaporo
CAMP	:	Péptido catiónico antimicrobiano
DNA	:	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	:	Ácido etilendiaminotetraacético
GlcN	:	Glucosamina
Gm	:	Gentamicina
h	:	Horas
IC	:	Índice de competencia
IL-1 β	:	Interleuquina 1 β
Kan	:	Kanamicina
Kan ^R	:	Resistencia a kanamicina
Kdo	:	Ácido 3-desoxi-D-mano-oct-2-ulopiranosónico
L-Ara4N	:	Aminoarabinosa
LB	:	Luria-Bertani
LPS	:	Lipopolisacárido
PAMPs	:	Patrones moleculares asociados a patógenos
pEtN	:	fosfoetanolamina

min	:	Minutos
MOI	:	Multiplicidad de infección
OD _{600nm}	:	Densidad óptica medida a 600 nanómetros
PBS	:	Suero fisiológico tamponado con fosfato
PCR	:	Reacción de polimerasa en cadena
SAPLIP	:	Proteínas tipo saposin
SDS	:	Dodecilsulfato de sodio
seg	:	Segundos
SPI	:	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i>
Str	:	Estreptomicina
T3SS	:	Sistema de secreción de tipo 3
TAE	:	Tris-acetato-EDTA
TEMED	:	Tetrametiletilendiamina
TLR	:	Receptor tipo toll
TNF- α	:	Factor de necrosis tumoral α
UFC	:	Unidades formadoras de colonias
WT	:	Silvestre
x g	:	Aceleración gravitacional

RESUMEN

El lipopolisacárido (LPS) es un glicolípido complejo y componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram negativo que constituye la primera interfase de interacción y adaptación al ambiente. El LPS se compone de 3 dominios: el antígeno O (AgO), el *core* u oligosacárido central y el lípido A. Todos éstos pueden sufrir modificaciones estructurales para favorecer la supervivencia de la bacteria dentro del hospedero. Las alteraciones del lípido A afectan a la patogénesis de la bacteria al cambiar la permeabilidad de la membrana externa, promoviendo la resistencia a los péptidos antimicrobianos e interfiriendo con la capacidad del hospedero para reconocer el LPS. De la misma forma, se ha descrito que la ausencia del AgO afecta considerablemente a la supervivencia. Dentro de los genes involucrados en la modificación del LPS en *Salmonella*, se encuentran aquellos que codifican enzimas que modifican el lípido A, evitando la interacción de la bacteria con los péptidos antimicrobianos. Estos genes son *eptA* y el operón *arnBCADTEF*, que codifican enzimas que modifican químicamente a los grupos fosfatos, enmascarando la carga negativa del lípido A; y los genes *lpxO*, *lpxR* y *pagP*, los cuales codifican enzimas que modifican las cadenas aciladas del lípido A. Por último, el gen involucrado para ligar el AgO al lípido A es *waaL*. Todos estos genes de *Salmonella* han sido ampliamente estudiados, en específico en la interacción de ellos en células eucariontes de mamíferos, pero *Salmonella* no solo se enfrenta a este tipo de células.

Durante su ciclo de vida, *Salmonella* debe sobrevivir en el medio ambiente, donde existe una amplia variedad de bacterias, bacteriófagos, plantas y en especial, está expuesta a la depredación por protozoos, incluyendo a las amebas. Para evitar esto, la bacteria ha desarrollado estrategias para sobrevivir dentro de estos organismos, logrando quedar protegida de condiciones ambientales desfavorables y transformando así a los protozoos en un reservorio ambiental.

Es por esto que el propósito central de esta tesis se enfocó en estudiar los genes descritos para la supervivencia intracelular de *Salmonella* Typhimurium en células

eucariontes de mamíferos: *eptA*, *arnBCATDEF*, *waaL*, *lpxO*, *lpxR* y *pagP*, y evaluar en primera instancia si estos genes contribuyen tanto para sobrevivir al péptido polimixina B en un ensayo de sensibilidad, como su aporte a la supervivencia intracelular de *Salmonella* en las amebas, utilizando como modelo de estudio la ameba *Disctyostelium discoideum*.

Para evaluar la supervivencia de las mutantes frente a péptidos antimicrobianos, se realizó un ensayo de sensibilidad al péptido polimixina B en el que las mutantes crecidas en un medio inductor del sistema PhoP/PhoQ se incubaron con distintas concentraciones del péptido para luego determinar el título de bacterias sobrevivientes. Nuestros resultados mostraron que las mutantes Δ *arnBCADTEF* y Δ *waaL* de *S. Typhimurium* son más sensibles que la cepa WT a polimixina B, mientras que las otras mutantes no presentaron diferencias, siendo igual de sensibles que la cepa WT.

Luego, se evaluó la supervivencia intracelular de todas las mutantes en *D. discoideum* AX2 mediante la realización de ensayos de infección competitiva con una mezcla de cada cepa mutante y la cepa WT, usando una multiplicidad de infección de 100 bacterias/ameba. Los resultados de estos ensayos muestran que la supervivencia de las cepas Δ *arnBCADTEF*, Δ *eptA* y Δ *lpxR* en la ameba fue menor que la de la cepa WT.

Por último, para evaluar si estos resultados se deben a la interacción con péptidos antimicrobianos de la ameba, se evaluó la supervivencia de las bacterias mutantes realizando ensayos de infección competitiva en una mutante de *D. discoideum* que es incapaz de producir el amebaporo AplD. Los resultados obtenidos muestran que las mutantes Δ *arnBCADTEF* y Δ *eptA* presentaron una supervivencia similar a la cepa WT cuando la ameba no produce este péptido, lo que indicaría que *S. Typhimurium* necesita expresar estos genes para poder sobrevivir a este amebaporo. En conjunto, nuestros resultados demuestran la importancia de las modificaciones del LPS en la resistencia a péptidos antimicrobianos y en la supervivencia intracelular dentro en la ameba *D. discoideum*.

ABSTRACT

Role of lipopolysaccharide modifications of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in antimicrobial peptide resistance and intracellular survival in *Dictyostelium discoideum*

Lipopolysaccharide (LPS) is a complex glycolipid and major component of the outer membrane of Gram-negative bacteria that constitutes the first interface of interaction and adaptation to the environment. LPS is composed of 3 domains: antigen O (AgO), the core or central oligosaccharide and lipid A. All of these can undergo structural modifications to favor the survival of the bacterium within the host. Lipid A alterations affect bacterial pathogenesis by changing the permeability of the outer membrane, promoting resistance to antimicrobial peptides, and interfering with the host's ability to recognize LPS. Likewise, it has been described that the absence of AgO significantly affects survival. Among the genes involved in the modification of LPS in *Salmonella* are those which encode enzymes that modify lipid A, preventing the interaction of the bacterium with antimicrobial peptides. These genes are *eptA* and the *arnBCADTEF* operon, which encode enzymes that chemically modify the phosphate groups, masking the negative charge of lipid A; and the *lpxO*, *lpxR* and *pagP* genes, which encode enzymes that modify the acylated chains of lipid A. Finally, the gene involved in binding AgO to lipid A is *waaL*. All these genes have been extensively studied, specifically their interaction in mammalian eukaryotic cells, but *Salmonella* does not only face this type of cells.

During its life cycle, *Salmonella* must survive in the environment, where it is exposed to a wide variety of bacteria, bacteriophages, plants and especially to predation by protozoa, including amoebae. To avoid this, the bacteria have developed strategies to survive within these organisms, managing to be protected from unfavorable environmental conditions and thus transforming the protozoa into an environmental reservoir.

For this reason, the main purpose of this thesis was focused on studying the genes described for intracellular survival of *Salmonella* Typhimurium in mammalian eukaryotic cells: *eptA*, *arnBCATDEF*, *waaL*, *lpxO*, *lpxR* and *pagP*, and to evaluate

in the first instance whether these genes contribute both to survive the polymyxin B peptide in a sensitivity assay, and their contribution to the intracellular survival of *Salmonella* in amoebae, using the amoeba *Disctyostelium discoideum* as a study model.

To evaluate the survival of mutants against antimicrobial peptides, a polymyxin B peptide sensitivity assay was performed in which mutants grown in a PhoP/PhoQ system inducing medium were incubated with different concentrations of the peptide and then determine the titer of surviving bacteria. Our results showed that the Δ *arnBCADTEF* and Δ *waaL* mutants of *S. Typhimurium* are more sensitive than the WT strain to polymyxin B, while the other mutants showed no differences, being equally sensitive as the WT strain.

Next, the intracellular survival of all mutants in *D. discoideum* AX2 was evaluated by performing competitive infection assays with a mixture of each mutant strain and the WT strain, using a multiplicity of infection of 100 bacteria/amoeba. The results of these assays show that the survival of the Δ *arnBCADTEF*, Δ *eptA* and Δ *lpxR* strains in the amoeba was lower than that of the WT strain.

Finally, to assess whether these results are due to interaction with antimicrobial peptides from the amoeba, the survival of the mutant bacteria was evaluated by performing competitive infection assays on a *D. discoideum* mutant that is unable to produce the amoebapore ApID. The results show that the Δ *arnBCADTEF* and Δ *eptA* mutants presented similar survival to the WT strain when the amoeba does not produce this peptide, which would indicate that *S. Typhimurium* needs to express these genes to survive this amoebapore. Taken together, our results demonstrate the importance of LPS modifications in antimicrobial peptide resistance and intracellular survival in *D. discoideum*.

1.-INTRODUCCIÓN

1.1.- Generalidades de *Salmonella*

Salmonella corresponde a un género de bacterias Gram negativo, anaerobias facultativas, pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae (Barlow & Hall 2002). El género comprende dos especies, *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*, las que incluyen más de 2,500 serovares que pueden ser diferenciados mediante variaciones de distintos antígenos de superficie (Reeves *et al.*, 1989). Dentro de los serovares que conforman la especie *S. enterica* se encuentran los serovares “especialistas”, que presentan un espectro limitado de hospederos o incluso un hospedero específico. Este es el caso de *S. enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*), responsable de la fiebre tifoidea y que tiene de hospedero exclusivo al ser humano, o de *S. enterica* serovar Gallinarum que infecta sólo a aves. Por otra parte, los serovares “generalistas” infectan a un amplio rango de hospederos, incluyendo aves de corral, roedores, bovinos e incluso humanos, como por ejemplo *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Estos son los serovares más estudiados debido al alto impacto que provocan sobre la salud pública, siendo ambos causantes de gastroenteritis en humanos. De hecho, en un estudio publicado el año 2010, se reportaron alrededor de 93,8 millones de cuadros de gastroenteritis aguda y 155.000 muertes anuales a nivel mundial provocados por ambos serovares (Majowicz *et al.*, 2010).

1.2.- Ciclo infeccioso de *Salmonella*

El ciclo infeccioso de *Salmonella* se inicia a través de la ingesta de alimentos o agua contaminados (García del Portillo *et al.*, 1993). Durante la infección, *Salmonella* emplea dos sistemas de secreción de tipo 3 (T3SS) codificados en las islas de patogenicidad 1 y 2 (SPI-1 y SPI-2, respectivamente). Estos sistemas de secreción son estructuras macromoleculares utilizadas para inyectar proteínas efectoras en las células del hospedero y resultan fundamentales para la infección por *Salmonella*

(Waterman & Holden, 2003). El T3SS codificado en la SPI-1 (T3SS-1) es requerido durante la fase intestinal de la infección y permite la invasión de células epiteliales mediante la translocación de efectores que inducen la reorganización del citoesqueleto de actina, induciendo la endocitosis de la bacteria por estas células no fagocíticas, la que alcanza el subepitelio mediante un proceso de transcitosis. Es aquí cuando los macrófagos y células dendríticas presentes en la submucosa reconocen y fagocitan a *Salmonella*. Dentro de estas células fagocíticas se expresa el T3SS codificado en la SPI-2 (T3SS-2), el cual es requerido para que *Salmonella* tome control de la vía endocítica para evitar la fusión del fagosoma con el lisosoma y generar la “vacuola contenedora de *Salmonella*”, compartimiento membranoso donde la bacteria puede sobrevivir y replicarse intracelularmente en el hospedero (Cirillo *et al.*, 1998; Rappl *et al.*, 2003). Finalmente, el reconocimiento de *Salmonella* por los macrófagos a través de sus receptores TLR (*Toll Like Receptors*), los cuales reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, *Pathogen associated molecular patterns*) como el lipopolisacárido (LPS) y el flagelo (Raffatellu *et al.*, 2006), desencadena un infiltrado severo de neutrófilos, generando una respuesta inflamatoria local (Rosenberger *et al.*, 2000). Gracias a esta respuesta, es posible eliminar a la bacteria a través de una diarrea inflamatoria (Elfenbein *et al.*, 2013).

1.3.- Interacción de *Salmonella* con protozoos

Una parte del ciclo infeccioso de *Salmonella* que no ha sido estudiada en profundidad es su supervivencia en el medio ambiente. Esto es importante debido a que *Salmonella* permanece gran parte del tiempo en el ambiente, compartiendo con una amplia variedad de bacterias, bacteriófagos, agente químicos tóxicos, plantas y, en especial, está expuesta a la depredación por protozoos, incluyendo a las amebas (**Figura 1**). Éstos son organismos unicelulares que habitan en suelos, donde se alimentan de bacterias y hongos mediante fagocitosis, siendo considerados como verdaderos depredadores ambientales (Harf, 1994). Para poder sobrevivir, las bacterias han desarrollado distintos mecanismos para evitar la fagocitosis o la

degradación una vez que ya están dentro del protozoo. Un ejemplo de estos mecanismos es el que utiliza *Legionella pneumophila*, que ocupa a la ameba *Acanthamoeba castellanii* para replicarse y sobrevivir en ella. En un estudio realizado en 1980 se observó que esta bacteria es capaz de sobrevivir dentro de vacuolas en la ameba (Rowbotham, 1980). En estudios posteriores, se observó que esta bacteria requiere los mismos genes para sobrevivir tanto dentro de los macrófagos como dentro de esta ameba (Segal & Suman, 1999). Otro ejemplo es el de *Escherichia coli* y *S. Typhimurium*, que tienen la capacidad de sobrevivir en el interior de vacuolas de diferentes especies de *Acanthamoeba* (Gaze *et al.*, 2003; Tezcan-Merdol *et al.*, 2004). De este modo, las amebas podrían entregar protección frente a diversas condiciones ambientales que no son favorables para la bacteria. Por ejemplo, *A. castellanii*, que se encuentra en suelos, fagocita a *S. Typhimurium* y la protege de los procesos de cloración de tratamientos de agua (King *et al.*, 1988). Así, los protozoos actuarían como reservorios y posibles vectores ambientales de bacterias patógenas.

La investigación sobre la interacción *Salmonella* con protozoos comenzó cuando se describió que *S. Typhimurium* es capaz de sobrevivir y replicarse dentro de vesículas contráctiles al interior de *A. polyphaga* (Gaze *et al.*, 2003). Este estudio sugiere que la supervivencia de *Salmonella* dentro de protozoos sería de vital importancia como parte del ciclo de vida de la bacteria en el medio ambiente. Luego de esto, diferentes estudios han establecido que otros serovares de *Salmonella* tienen la capacidad de sobrevivir en distintas especies de protozoos de los géneros *Acanthamoeba* y *Tetrahymena*, entre otros (Feng *et al.*, 2009; Rehfuss *et al.*, 2011).

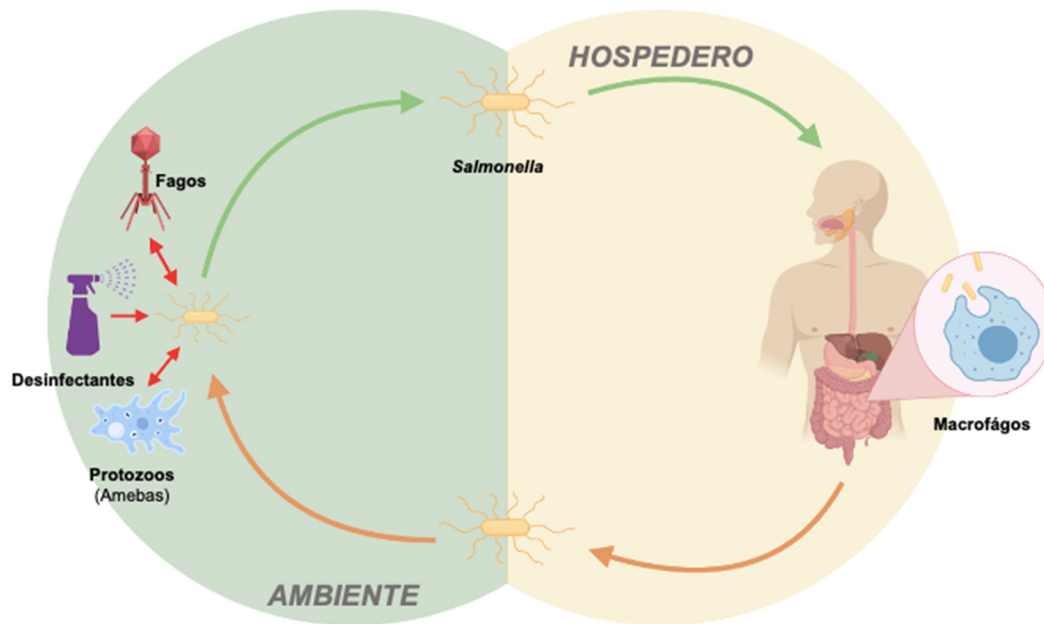


Figura 1. Ciclo de vida de *Salmonella*. Luego de ser eliminada del hospedero, *Salmonella* se encuentra en el ambiente con diversas condiciones adversas, ilustrados en la figura como desinfectantes, fagos y protozoos. Estos últimos podrían ser utilizados como reservorios ambientales por la bacteria.

1.4.- *Dictyostelium discoideum* como organismo modelo para el estudio de la interacción bacteria-hospedero

Las amebas se alimentan de bacterias mediante fagocitosis, utilizando mecanismos similares a los establecidos en macrófagos. Estos procesos han perdurado durante la evolución, siendo muy conservados entre diferentes células eucariontes (Steinert *et al.*, 2003; Cosson & Lima, 2014). Estos dos tipos celulares son catalogados como fagocitos profesionales, lo que hace suponer que las bacterias podrían haber desarrollado mecanismos moleculares similares para así evitar ser fagocitadas o poder sobrevivir dentro de ambos.

En este proyecto de tesis se trabajó con el protozoo *Dictyostelium discoideum*, una ameba social que puede encontrarse en suelos de bosque y hojas caídas. Cuando existe una cantidad de bacterias suficientes para alimentarse, esta ameba crece de forma unicelular; sin embargo, cuando escasean los nutrientes forma agregados celulares que luego se diferencian a distintos tejidos, conformando un organismo

pluricelular (Eichinger, 2003). Su uso como organismo modelo se debe en parte a que el cultivo de esta ameba en el laboratorio resulta relativamente sencillo y a que este organismo es idóneo para la aplicación de técnicas bioquímicas, genéticas y de biología molecular. Además, su genoma se encuentra secuenciado y disponible para los investigadores (Bozzaro & Eichinger, 2011) y junto con la existencia de la base de datos “dictyBase” (<http://dictybase.org/>), donde se encuentra información general sobre *Dictyostelium* (por ejemplo rutas metabólicas, protocolos, cepas, etc), hace que la investigación en esta ameba sea mucho más fácil. En nuestro laboratorio se han realizado estudios para dilucidar y comparar a escala genómica los genes requeridos para la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en macrófagos murinos RAW264.7 y en *D. discoideum* (Sabag, 2017). Las bases de datos obtenidas se alinearon y se identificaron mutantes que presentaron defectos en la supervivencia intracelular en ambos sistemas. En conjunto, el análisis comparativo permitió identificar mutantes en 213 genes de *S. Typhimurium* que presentaron estos defectos tanto en macrófagos como en la ameba. Una de las categorías funcionales que tuvo mayor representación en este análisis comparativo se relacionó con genes involucrados en la biosíntesis y modificaciones del LPS.

1.5.- El lipopolisacárido de *Salmonella Typhimurium*

El LPS es un glicolípido complejo presente en la membrana externa de las bacterias Gram negativo. Posee tres dominios estructurales: el lípido A, el *core* de oligosacáridos y el antígeno O (AgO) (**Figura 2**). El lípido A es el ancla que une el LPS a la membrana externa y es responsable de la actividad tóxica de la molécula, por lo que se le conoce como endotoxina. Por su parte, en el *core* se puede distinguir una porción interna y una externa. En esta última se encuentra anclado el AgO, el cual consiste en unidades repetitivas de oligosacáridos (Raetz & Whitfield, 2002; Rietschel *et al.*, 1994). Dentro de la estructura del LPS, tanto el lípido A como el *core* se encuentran conservados en todas las enterobacterias, a diferencia del AgO, el cual presenta variabilidad en cuanto a los azúcares que lo constituyen, el orden

en que se disponen y en el grado de polimerización de la cadena que forman (Caroff & Karibian, 2003).

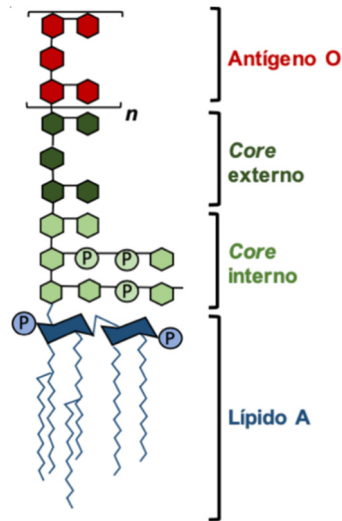


Figura 2. Estructura del lipopolisacárido de *S. Typhimurium*. En el esquema se muestran los distintos dominios que conforman el LPS de *S. Typhimurium*: el lípido A en azul, el *core* interno y externo en verde y el AgO en rojo. Adaptado de Maeshima & Fernandez, 2013.

La ruta biosintética del LPS comienza en la cara citoplasmática de la membrana plasmática, a través de un proceso complejo en el que participan muchas enzimas y proteínas estructurales codificadas por más de 50 genes, las que llevan a cabo reacciones de síntesis, exportación y ensamblaje de la molécula (Raetz & Whitfield, 2002; Samuel & Reeves, 2003). Nueve de estos genes codifican enzimas que operan secuencialmente en la biosíntesis del lípido A-Kdo2, la cual transcurre en el citoplasma y sobre la cara interior de la membrana plasmática (Raetz & Whitfield, 2002; Wang & Quinn, 2010; Valvano, 2015). Luego, la síntesis del LPS prosigue con la adición sucesiva de azúcares sobre el lípido A-Kdo2 por acción de una serie de glicosiltransferasas, hasta generar el lípido A-core (Roncero & Casadaban, 1992; Schnaitman & Klena, 1993; Wang & Quinn, 2010). La molécula de LPS se completa en la cara periplasmática de la membrana plasmática, donde el AgO, sintetizado y

polimerizado independientemente, es ligado al lípido A-core por acción de la ligasa WaaL (Woodward et al., 2010; Whitfield *et al.*, 1997; Abeyrathne *et al.*, 2005).

1.6.- Dinámica estructural del lípido A en *S. Typhimurium*

El lípido A es un glicolípido constituido por glucosamina (GlcN) (Raetz & Whitfield, 2002; Nikaido, 2003) y es el ligando canónico del receptor TLR4/MD2 en los macrófagos (Molinaro *et al.*, 2015; Akira *et al.*, 2006). Niveles bajos del lípido A inducen a los macrófagos a sintetizar citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la interleuquina 1 β (IL-1 β) (Beutler & Cerami, 1988).

La estructura del lípido A es susceptible a sufrir modificaciones, las cuales son catalizadas por enzimas que se expresan en respuesta a las condiciones ambientales a las cuales la bacteria se ve expuesta durante su ciclo infeccioso (Raetz *et al.*, 2007). La expresión de los genes que codifican muchas de las enzimas implicadas en la modificación del lípido A es controlada por los sistemas de dos componentes PmrA-PmrB y/o PhoP-PhoQ, que están asociados a la regulación de la virulencia y supervivencia bacteriana, entre otras funciones (Miller *et al.*, 1989; Gunn *et al.*, 2000; Gunn, 2008). Estos sistemas se activan en ambientes con una baja concentración de cationes divalentes, disponibilidad de oxígeno y pH ligeramente ácido, condiciones a las que típicamente la bacteria está expuesta durante la infección (Alpuche-Aranda *et al.*, 1992; Soncini *et al.*, 1996; Wösten *et al.*, 2000; Needham & Trent, 2013).

Las modificaciones del lípido A afectan directamente a la patogénesis de la bacteria al cambiar la permeabilidad de la membrana externa, al promover la resistencia a los péptidos catiónicos antimicrobianos (CAMPs) y al interferir con la capacidad del hospedero para reconocer el LPS como PAMP (Raetz *et al.*, 2007). Dentro de las enzimas modificadoras del lípido A (resumidas en la **Figura 3**) está PagP, que es una palmitoiltransferasa encargada de generar un lípido A heptaacilado (Guo *et al.*, 1998). También *S. Typhimurium*, el factor transcripcional PhoP a través del sistema de dos componentes PmrA/PmrB regula positivamente al operón *arnBCADTEF*

(también conocido como *pmrHFIJKLM*) y *eptA* (también conocido como *lptA* y *pmrC*), que codifican enzimas que transfieren grupos 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa (también llamado aminoarabinosa o L-Ara4N) y fosfoetanolamina (pEtN) al lípido A, respectivamente (Gunn, 2008). Ambos grupos, fosfoetanolamina y L-Ara4N, permiten enmascarar la carga negativa de los fosfatos del lípido A, reduciendo la susceptibilidad de la bacteria a CAMPs (Gunn *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2004). Por su parte, LpxO es una dioxigenasa que cataliza la hidroxilación de una cadena acilada del lípido A, dando lugar al motivo S-2-hidroximiristato. La combinación de estas modificaciones genera una membrana externa remodelada con una reducción de la carga negativa neta, lo que mejora la virulencia de la bacteria (Miller *et al.*, 1989; Moskowitz *et al.*, 2004). Varios estudios han demostrado cómo estas modificaciones influyen en la susceptibilidad de la bacteria frente a distintos péptidos antimicrobianos. Por ejemplo, un estudio realizado el año 2006 demostró que mutantes de *E. coli* que carecían del gen *eptA* eran susceptibles a PMBN, un péptido antimicrobiano cíclico (Kim *et al.*, 2006). Así mismo, se ha demostrado que las cepas de *S. Typhimurium* carentes del gen *arnT* son más sensibles que la cepa WT al péptido antimicrobiano polimixina B (Tran *et al.*, 2005; Murray *et al.*, 2007; Tamayo *et al.*, 2005; Kawasaki *et al.*, 2005). Por otro lado, LpxR corresponde a una 3'-O-desacilasa que cataliza la producción del lípido A tetraacilado (Rutten *et al.*, 2009). Este gen ha sido descrito en *Helicobacter pylori* como prescindible frente a la acción de péptidos antimicrobianos (Cullen *et al.*, 2011), pero necesario para la supervivencia intracelular en macrófagos (Kawano *et al.*, 2010). Finalmente, se ha demostrado que la actividad de PagP afecta la resistencia al péptido antimicrobiano defensina, siendo más susceptible la cepa que carece de este gen (Goto *et al.*, 2017, Gunn *et al.*, 1996).

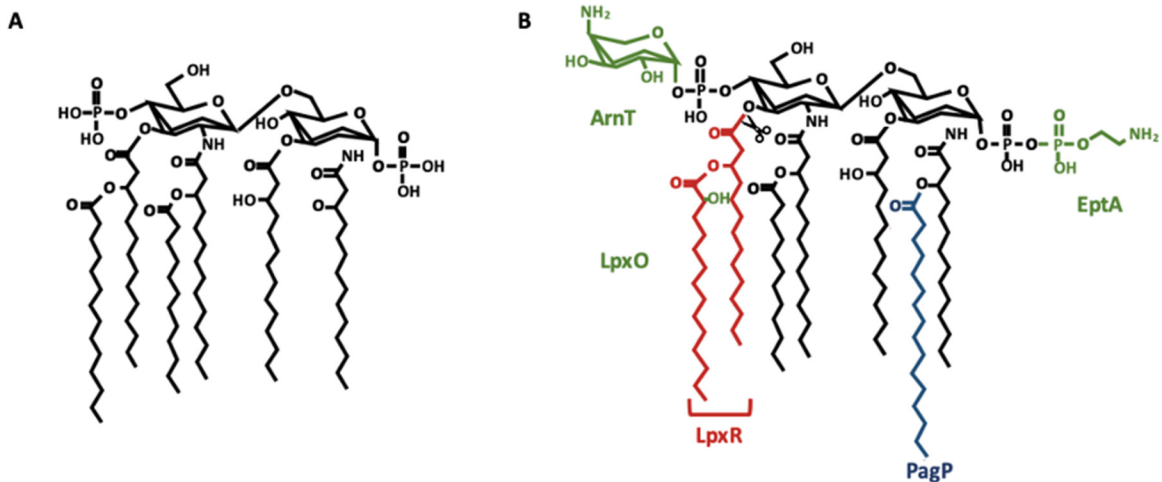


Figura 3. Estructura y modificaciones covalentes del lípido A de *Salmonella*. (A) Estructura canónica del lípido A de *Salmonella*, sin modificaciones. (B) Modificaciones covalentes que puede sufrir el lípido A de *Salmonella*. En verde se muestran los grupos aminoarabinosa (agregado por ArnT), fosfoetanolamina (agregado por EptA) e hidroxilo (agregado por LpxO). En rojo se muestran las cadenas aciladas que son extraídas por la desacilasa LpxR. La cadena acilada en color azul corresponde al palmitato que agrega la palmitoil transferasa PagP. Adaptado de Raetz & Whitfield, 2002.

1.7.- Rol del AgO de *S. Typhimurium* en la relación patógeno-hospedero

El AgO también es necesario para la supervivencia de las bacterias en su entorno natural. Además, este polímero desempeña un papel relevante en la virulencia debido a que, por ser la porción más externa de la superficie bacteriana, constituye la primera línea de interacción entre la bacteria y el hospedero. El AgO esconde los grupos fosfatos cargados negativamente del *core* y del lípido A, dificultando la atracción electrostática entre los CAMPs y estos grupos (Matamouros & Miller, 2015). La presencia del AgO ha mostrado especial importancia en la resistencia a la polimixina B, debido a que una mutante de *S. Typhimurium* carente del AgO muestra alta susceptibilidad a este péptido (Hölzer *et al.*, 2009). Más aún, no sólo la presencia, sino también el grado de polimerización del AgO es importante en este proceso, ya que cepas de *S. Typhimurium* carentes de especies de AgO largo o muy largo presentan un leve aumento en la susceptibilidad a polimixina B (de las Mercedes *et al.*, 2011; Hölzer *et al.*, 2009). Todo esto sugiere que cadenas cortas

de AgO no son suficientes para proveer una barrera efectiva contra la polimixina B y posiblemente contra otros péptidos antimicrobianos.

Uno de los genes importantes para el ensamblaje del AgO es *waaL*. Este gen codifica la ligasa del AgO, que se requiere para la producción de una estructura completa del LPS (Reddington *et al.*, 1991). Las mutantes nulas del gen *waaL* son incapaces de unir el AgO al lípido A-core en la estructura del LPS, adquiriendo un fenotipo “rugoso” (Lahteenmaki *et al* 2005). Por su parte, en un estudio realizado en nuestro laboratorio se muestra que las mutantes de *S. Typhimurium* carentes del gen *waaL* presentan problemas para sobrevivir intracelularmente en la ameba *D. discoideum* (Riquelme *et al.*, 2016).

1.8.- *Dictyostelium discoideum* y péptidos con actividad antimicrobiana

Tanto *D. discoideum* como los macrófagos emplean estrategias conservadas para eliminar bacterias. Estas estrategias han sido extensamente estudiadas en los macrófagos, cuya principal función en la defensa del hospedero contra la infección es la fagocitosis de microorganismos y su subsecuente eliminación. En este contexto, el contacto inicial con el organismo invasor gatilla la producción de metabolitos tóxicos de oxígeno, como peróxido de hidrógeno y radical superóxido (Goldstein *et al.*, 1992). Los mecanismos independientes del oxígeno incluyen la acidificación del fagosoma y la degradación de su contenido por proteínas o péptidos con actividad antimicrobiana (AMP) (Fields *et al.*, 1989). La unión de estos péptidos distorsiona la integridad de la membrana e incrementa su permeabilidad al péptido mismo, el que luego de cruzar la membrana externa es capaz de interactuar con la superficie lipídica de la membrana plasmática, donde finalmente ejerce su actividad lítica (Hancock, 2001). En *D. discoideum*, por su parte, el pH bajo en el fagosoma no es suficiente para eliminar a las bacterias, requiriéndose además una serie de proteasas, hidrolasas, lisozimas y péptidos antimicrobianos para la ruptura de varios componentes bacterianos o para desorganizar la integridad de su envoltura (Dunn *et al.*, 2018). Así, *Salmonella* al ser fagocitada por la ameba, enfrentaría moléculas denominadas amebaporos, cuyo mecanismo de acción es

semejante al de los péptidos catiónicos antimicrobianos presentes en macrófagos y neutrófilos (Leippe, 1999).

De acuerdo con la información derivada del proyecto genoma, *D. discoideum* posee genes que codifican proteínas que poseen como blanco membranas bacterianas, las que, de esta forma, pueden eliminar directamente bacterias (Leippe, 2014). Estos genes son aquellos que codifican proteínas tipo saposina (SAPLIPs). SAPLIPs con actividad antimicrobiana pueden ser encontradas en diversos organismos, desde protozoos hasta mamíferos (Andersson *et al.*, 1995). En las amebas, éstas son conocidas por ser proteínas formadoras de poro cuya función es permeabilizar las membranas de las bacterias y células humanas (Leippe, 2014). Estructuralmente, las SAPLIPs se caracterizan por poseer por 4 o 5 hélices α compactadas y estabilizadas por 3 puentes disulfuro, constituidos por 6 residuos de cisteína altamente conservados en su estructura (Liepinsh *et al.*, 1997). Funcionalmente, las SAPLIPs cumplen varias funciones biológicas, pero los miembros de esta familia tienen en común que interactúan con lípidos y membranas (Munford *et al.*, 1995; Bruhn, 2005).

En un estudio realizado en Alemania, los autores llamaron provisionalmente a las proteínas SAPLIP identificadas en *D. discoideum* como Apls (*amoebapore-like peptides*) (Dhakshinamoorthy *et al.*, 2018). *D. discoideum* posee 17 genes relacionados a Apls (**Figura 4**) que codifican 33 péptidos SAPLIP, debido a que las proteínas precursoras más grandes poseen más de un dominio SAPLIP en su estructura. En *D. discoideum* estas proteínas actúan de forma complementaria y sinérgica, constituyendo una parte importante del arsenal antimicrobiano durante sus etapas de vida unicelular y multicelular. En el mismo estudio se caracterizó la proteína AplD, debido a que su secuencia primaria contiene sólo un dominio SAPLIP y, más importante, debido a que el gen *aplD* se expresa durante todas las etapas del ciclo de vida de *D. discoideum*, por lo que se piensa que puede ser fundamental (Dhakshinamoorthy *et al.*, 2018). Los resultados obtenidos muestran que la cepa de *D. discoideum* que carece de este amebaporo posee deficiencias de crecimiento cuando es expuesta a distintas cepas de *Klebsiella pneumoniae*, por lo que estudiar

los efectos de la ausencia de AplD en la ameba frente a *S. Typhimurium* resulta interesante.

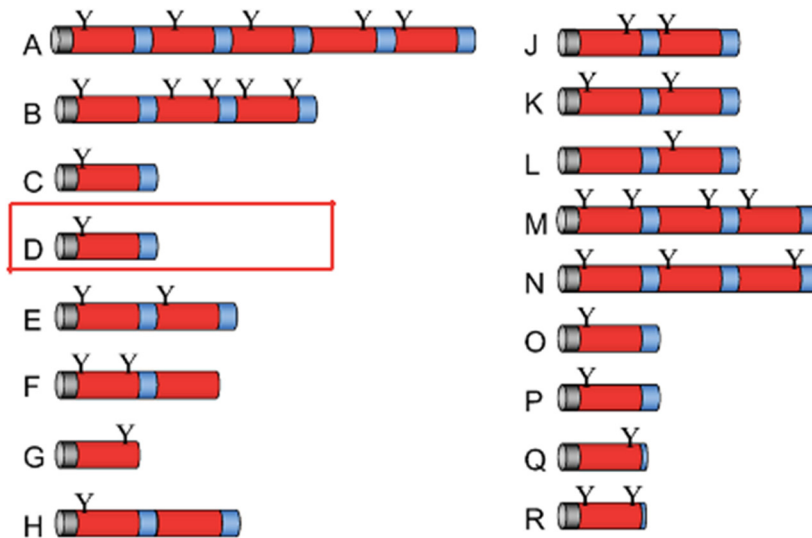


Figura 4. Arquitectura molecular de las proteínas precursoras de Apl. El genoma de *D. discoideum* contiene 17 genes que codifican 33 amebaporos SAPLIPs. En gris se muestra el péptido señal, en rojo el dominio SAPLIP, en azul las regiones de término de traducción y con la letra Y los sitios potenciales de N-glicosilación. En el recuadro rojo se destaca el amebaporo que se utilizará en esta tesis. Adaptado de Dhakshinamoorthy *et al.*, 2018.

Considerando los antecedentes mencionados, en este trabajo de investigación se propone determinar, en primera instancia, cómo las delecciones de genes que codifican proteínas que modifican el lípido A y el AgO contribuyen a la supervivencia de *Salmonella* frente al péptido antimicrobiano polimixina B y posteriormente si estos mismos genes contribuyen a la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en la ameba *D. discoideum* cuando carece del amebaporo AplD.

Se espera que los resultados obtenidos en este trabajo permitan comprender de mejor manera cómo *Salmonella* combate los mecanismos bactericidas ejercidos por la ameba *D. discoideum* y así sobrevivir a la depredación por parte de amebas en el medio ambiente.

2.- HIPÓTESIS

El lipopolisacárido es el principal componente de la cara extracelular de la membrana externa en bacterias Gram negativo. La estructura del LPS, que consta del antígeno O, el “core” de oligosacáridos y el lípido A, es modificada en respuesta a cambios en los ambientes que la bacteria encuentra durante su ciclo de vida, tanto en el medio ambiente como cuando infecta al hospedero. Esto permite la supervivencia bacteriana frente a distintas condiciones adversas a las que se enfrenta. Particularmente, el AgO y la modificación del lípido A por acción de un conjunto de enzimas proporcionan resistencia a AMPs. Dentro de las amenazas con las que se encuentra la bacteria en el medio ambiente están los protozoos, en particular las amebas, las cuales se alimentan de bacterias. En nuestro laboratorio hemos observado que *Salmonella* utiliza mecanismos similares para sobrevivir en células de hospederos mamíferos y en amebas. Para esto, hemos utilizado la ameba *D. discoideum* como organismo modelo para estudiar la interacción patógeno-hospedero. Los AMPs en las amebas son conocidos como amebaporos. En el caso de *D. discoideum*, cuenta con 17 genes que codifican estos péptidos; sin embargo, se desconoce su rol durante la interacción de la ameba con *Salmonella*. En base a estos antecedentes, se formula la siguiente hipótesis:

“Genes de *Salmonella* Typhimurium involucrados en la modificación estructural del lipopolisacárido contribuyen a la resistencia a péptidos antimicrobianos y a la supervivencia intracelular en *Dictyostelium discoideum*”.

3.- OBJETIVO GENERAL

Determinar si los genes *arnBCADTEF*, *eptA*, *waaL*, *lpxO*, *lpxR* y *pagP*, que codifican enzimas que modifican la estructura del lipopolisacárido de *Salmonella* Typhimurium, contribuyen a la resistencia a péptidos antimicrobianos y a la supervivencia intracelular en *Dictyostelium discoideum*.

4.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Determinar la participación de los genes *arnBCADTEF*, *eptA*, *waaL*, *lpxO*, *lpxR* y *pagP* en la susceptibilidad de *S. Typhimurium* a polimixina B.

Se generaron mutantes de *S. Typhimurium* por delección de los genes *arnBCADTEF*, *eptA*, *waaL*, *lpxO*, *lpxR* y *pagP*. Posteriormente, se realizaron ensayos de sensibilidad a polimixina B con las distintas cepas mutantes y la cepa WT.

2.- Evaluar contribución de los genes *arnBCADTEF*, *eptA*, *waaL*, *lpxO*, *lpxR* y *pagP* en la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*.

Se evaluó la supervivencia intracelular de las distintas mutantes de *S. Typhimurium* en *D. discoideum* mediante ensayos de infección por competencia con la cepa WT.

3.- Evaluar contribución de los genes *arnBCADTEF*, *eptA*, *waaL*, *lpxO*, *lpxR* y *pagP* en la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en una cepa de *D. discoideum* que carece del amebaporo AplD.

Se realizaron ensayos de infección por competencia para las distintas mutantes de *S. Typhimurium*, evaluando su supervivencia intracelular en una cepa de la ameba que carece del péptido antimicrobiano AplD.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Reactivos

A continuación se señalan los proveedores y los insumos adquiridos desde cada uno para el desarrollo de esta tesis.

De BIOTIUM (CA, USA): Colorante fluorescente para ácido nucleicos GelRed™.

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

De Corning Inc. (NY, USA): Suero fisiológico tamponado con fosfato (PBS).

De Difco Laboratories (MI, USA): Triptona y extracto de levadura.

De IDT (IO, USA): Oligonucleótidos partidores para PCR.

De Invitrogen Life Technologies (CA, USA): *Taq* DNA polimerasa, acrilamida, N,N'-metilenbisacrilamida ultrapura, agarosa ultrapura.

De Gibco (NY, USA): Colorante azul de tripán.

De Merck (NJ, USA): Cloruro de sodio (NaCl), fosfato dibásico de potasio (K₂HPO₄), fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄), fosfato dibásico de sodio (Na₂HPO₄), polimixina B, glucosa, etanol absoluto, cloroformo, glicerol, isopropanol, metanol, solución amortiguadora TAE 50x, Tritón X-100 y filtros Millipore con poros de 0,22 µm de diámetro.

De New England Biolabs (Ipswich, MA, USA): Estándares de peso molecular de DNA de 1 Kb para electroforesis de ácidos nucleicos.

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

De Qiagen (CA, USA): Sistema comercial para purificación de productos de PCR "*QIAquick PCR Purification Kit*" y sistema comercial para extracción de DNA plasmidial "*QIAprep Spin Miniprep kit*".

De Sigma Chemical Co. (MO, USA): Kanamicina (Kan), ampicilina (Amp), gentamicina (Gm), estreptomycin (Str) y L-arabinosa.

De US Biological (Swampscott, MA, USA): Tris base.

5.2.- Cepas bacterianas

Todas las cepas bacterianas utilizadas durante el desarrollo de esta tesis se resumen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en esta tesis.

<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium		
Cepa	Genotipo/Fenotipo Relevante	Origen
14028s	Cepa WT	Stock del laboratorio
$\Delta waaL$	14028s $\Delta waaL::aph$ (Kan ^R)	Stock del laboratorio
$\Delta arnBCADTEF$	14028s $\Delta arnBCADTEF::aph$ (Kan ^R)	Stock del laboratorio
$\Delta aroA$	14028s $\Delta aroA::aph$ (Kan ^R)	Stock del laboratorio
$\Delta lpxO$	14028s $\Delta lpxO::aph$ (Kan ^R)	Este trabajo
$\Delta lpxR$	14028s $\Delta lpxR::aph$ (Kan ^R)	Este trabajo
$\Delta pagP$	14028s $\Delta pagP::aph$ (Kan ^R)	Este trabajo
$\Delta eptA$	14028s $\Delta eptA::aph$ (Kan ^R)	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
Cepa	Genotipo/Fenotipo Relevante	Origen
BW25113/pKD46	F ⁻ λ $\Delta(arad-araB)567 \Delta lacZ4787 lacI^+$ <i>rpoS396(Am) rph-1 \Delta(rhaD-rhaB)568 rrnB3</i> <i>hsdR514 / pKD46</i>	Stock del laboratorio
DH5 α /pCP20	F ⁻ phi80 <i>lacZM15 endA recA hsdR(r_K m_K)</i> <i>supE thi gyrA relA \Delta(lacZYA-argF)U169 /</i> <i>pCP20</i>	Stock del laboratorio
DH5 α λ <i>pir</i> /pCLF4	<i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA</i> <i>relA1 \Delta(lac-argF)U169 deoR phi80</i> <i>del(lac)M15 \lambda pir / pCLF4</i>	Stock del laboratorio

<i>Klebsiella aerogenes</i>		
Cepa	Genotipo/Fenotipo Relevante	Origen
DBS0351098	Cepa WT	Stock del laboratorio

5.3.- Plasmidios

Los plasmidios usados durante el desarrollo de esta tesis se describen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Plasmidios utilizados en esta tesis.

Plasmidio	Descripción	Origen
pKD46	<i>bla P_{BAD} gam bet exo oriR_{pSC101}(TS)</i> , Amp ^R (GenBank AY048746)	Datsenko & Wanner, 2000
pCP20	<i>bla cat cl857 λ_{PR} flp oriR_{pSC101}(TS)</i> , Amp ^R , Cam ^R	Datsenko & Wanner, 2000
pCLF4	<i>bla FRT aph FRT PS1 PS2 oriR6K P_{T7}</i> , Amp ^R , Kan ^R , (GenBank EU629214)	Santiviago <i>et al.</i> , 2009

5.4.- Partidores

Los oligonucleótidos partidores usados durante el desarrollo de tesis se presentan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Oligonucleótidos partidores utilizados en esta tesis.

Nombre	Secuencia 5'–3'
eptA_H1P1	ACGCATCAACATGTTAAAGCGCTTTCTTAAAAGACCTGTTGTGCAGG <u>CTGGAGCTGCTTC</u>
eptA_H2P2	ATCAGTATCTTCATTTCGCTTAGTCTCCTGCACGGTTGCAGCATATGAA <u>TATCCTCCTTAG</u>
eptA_Out5	GTGATGTGGTCGTTTCGTCAC
eptA_Out3	GACTCCAGACTATGCTCGGC
lpxO_H1P1	CAGTGACGTTATGTTCCGACGAATCATTATCGGTATTTTTGTGCAGG <u>CTGGAGCTGCTTC</u>

lpxO_H2P2	CGGCCCGGCTTCAGAGGAGGCTGAAAAGGATTATCGCGGCC <u>CATATG</u> <u>AATATCCTCCTTAG</u>
lpxO_Out5	TTTCATCTCCATCATGCCAA
lpxO_Out3	CGGATGGATAGACTCAAGGC
lpxR_H1P1	TTGCGCAACGATGATTGCCGCCATACTCAGTACGACCACAGTGCAG <u>GCTGGAGCTGCTTC</u>
lpxR_H2P2	TGGTGACGCCTCAGAAGAAGAAGGTGATGTCTCCGTTGAT <u>CATATGA</u> <u>ATATCCTCCTTAG</u>
lpxR_Out5	CGCACTCAGATAGCGAATGA
lpxR_Out3	AATCTGCGCCTGAACATACC
pagP_H1P 1	TTTGAACGGTATGTATGTTGCGATGATCATCAGAAAGTAT <u>GTGCAGG</u> <u>CTGGAGCTGCTTC</u>
pagP_H2P 2	CCCTTCCCATCAAAACTGGAAACGCATCCAGGCGAAATAC <u>CATATGA</u> <u>ATATCCTCCTTAG</u>
pagP_Out5	CCGACAAATAAAACGCCAGT
pagP_Out3	TGCATTTTGTCCAGTCGAAC
K1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT

Los segmentos subrayados en la secuencia de algunos partidores corresponden a aquellos que hibridan con las regiones P1 y P2 presentes en el plasmidio pCLF4.

5.5.- Medios y condiciones de cultivo bacteriano

Las cepas bacterianas se crecieron rutinariamente a 37°C en caldo Luria-Bertani (LB; extracto de levadura 10 g/L, triptona 5 g/L, NaCl 10 g/L). Cuando se necesitó medio de cultivo sólido, el caldo LB fue suplementado con Bacto-Agar 15 g/L como gelificante. Los inóculos para los distintos ensayos experimentales se prepararon en caldo LB y se incubaron con agitación a la misma temperatura. Cuando se requirió, el medio LB se suplementó con los antibióticos ampicilina (Amp; 100 µg/mL) o kanamicina (Kan; 75 µg/mL) para seleccionar bacterias transformantes o mutantes. Los cultivos bacterianos destinados para ensayos de sensibilidad a polimixina B se realizaron en medio mínimo N inductor del sistema PhoP/PhoQ (MES 100 mM pH 5.8, MgCl₂ 10 µM, KCl 5 mM, (NH₄)₂SO₄ 0,5 mM, KH₂PO₄ 1 mM, K₂SO₄ 0,5 mM) descrito por Lee *et al.*, 2004 suplementado con glucosa 0,4% y casaminoácidos 0,1%. Los cultivos se incubaron a 37°C con agitación orbital vigorosa para asegurar su oxigenación.

5.6.- Líneas celulares eucariontes y condiciones de cultivo celular

Las líneas celulares eucariontes usadas durante el desarrollo de esta tesis se indican en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Líneas celulares eucariontes utilizadas en esta tesis.

Línea Celular	Descripción	Origen
<i>D. discoideum</i> AX2 (DBS0235519)	Cepa WT axénica	Dicty Stock Center
<i>D. discoideum</i> AX2 <i>ApID</i> ⁻ (DDB0216216)	Cepa AX2 con delección del gen <i>apID</i>	Dhakshinamoorthy <i>et al.</i> , 2018

Las amebas se cultivaron inicialmente a 22°C sobre un césped de *Klebsiella aerogenes* DBS0351098 previamente crecido en placas de agar SM (10 g/L de glucosa, 10 g/L de peptona, 1 g/L de extracto de levadura, 1 g/L de MgSO₄ x 7H₂O, 1,9 g/L de KH₂PO₄, 0,6 g/L de K₂HPO₄, 20 g/L de Bacto-Agar, pH 6,4) y tratado con UV durante 20 min. Posteriormente, amebas obtenidas a partir de las placas de fagocitosis generadas en el agar SM se cultivaron en condiciones axénicas a 22°C en medio líquido HL5 (14 g/L de triptona, 7 g/L de extracto de levadura, 0,35 g/L de Na₂HPO₄, 1,2 g/L de KH₂PO₄, pH 6,3), suplementado con glucosa (14 g/L), Str (300 µg/mL) y Amp (100 µg/mL). A partir del primer subcultivo, las amebas se mantuvieron en medio HL5 suplementado con glucosa (14 g/L) y Amp (100 µg/mL). Las amebas fueron subcultivadas y utilizadas en los ensayos de infección cuando alcanzaron el 70-80% de confluencia en botellas de cultivo celular o cuando alcanzaron su fase exponencial (1-2 x 10⁶ células/mL) en medio líquido. Esto último se controló mediante tinción con azul de tripán y posterior recuento en cámara de Neubauer. Para los ensayos de infección por competencia siempre se utilizaron amebas provenientes del tercer al sexto subcultivo.

5.7.- Construcción de mutantes de *S. Typhimurium* 14028s por el método *Red-swap*

Las mutantes derivadas de *S. Typhimurium* 14028s que presentan deleciones en genes específicos, se construyeron mediante el método de intercambio alélico por recombinación homóloga de productos PCR dependiente de la recombinasa Red del fago λ (*Red-swap*), según lo descrito por Datsenko y Wanner (Datsenko & Wanner, 2000) con modificaciones (Santiviago *et al.*, 2009).

5.7.1.- Extracción de DNA plasmidial

Los plasmidios pKD46, pCP20 y pCLF4, se extrajeron desde sus respectivas cepas portadoras usando el sistema comercial “*QIAprep Spin Miniprep kit*” (Qiagen), según el protocolo del fabricante. Para ello, las cepas se cultivaron durante 24 h con agitación a 30°C (pKD46 y pCP20) o 37°C (pCLF4) en medio LB suplementado con Amp (pKD46 y pCP20) o con Kan (pCLF4). En la etapa final de la extracción, el DNA plasmidial se recuperó en 50 μ L de H₂O libre de nucleasas y se almacenó a 4°C hasta su uso.

5.7.2.- Obtención de productos de PCR para mutagénesis

Se utilizaron partidores de 60 nucleótidos (nombrados con la notación H1P1 y H2P2), los cuales en su extremo 5' contienen 40 nucleótidos de homología con las regiones que flanquean al gen blanco. Por otro lado, en su extremo 3' los partidores tienen 20 nucleótidos que hibridan con el extremo 5' o 3' del *cassette* de resistencia a Kan presente en el plasmidio pCLF4. Dentro del *cassette* y flanqueado por los sitios FRT (*Flp recombinase target sequence*) está contenido el gen *aph*, que codifica la enzima aminoglicósido 3'-fosfotransferasa, que confiere resistencia a Kan. A partir del plasmidio pCLF4 purificado, el *cassette* de resistencia a Kan se amplificó por PCR en las siguientes condiciones:

Mezcla de reacción		
Reactivo	Volumen (µL)	Concentración
Tampón PCR 10x	10	1x
MgCl ₂ [50 mM]	3	1,5 mM
dNTPs [10 mM]	2	0,2 mM
Partidor H1P1 [10 µM]	2	0,2 µM
Partidor H2P2 [10 µM]	2	0,2 µM
DNA (pCLF4)	1	-
Taq DNA polimerasa [5 U/µL]	0,8	0,04 U/µL
H ₂ O libre de nucleasas	79,2	-
Volumen final	100	

Programa de amplificación		
Temperatura (°C)	Tiempo (min:seg)	Ciclos
95	2:00	1
95	0:30	35
55	0:30	
72	1:45	
72	5:00	1
4	∞	-

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

5.7.3.- Preparación de bacterias electrocompetentes y transformación bacteriana

Un cultivo de *S. Typhimurium* 14028s crecido por 12 h en medio LB a 37°C con agitación, se subcultivó en dilución 1:100 en 20 mL de medio LB fresco y se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0,4–0,6. A fin de obtener bacterias electrocompetentes, toda la biomasa del cultivo se sedimentó por centrifugación a 3.420 x g a 4°C durante 10 min y se lavó 3 veces con 5 mL de H₂O MiliQ fría y estéril, descartando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento cada vez. Finalmente, el sedimento bacteriano se resuspendió en 1 mL de H₂O MiliQ fría y estéril.

S. Typhimurium 14028s se transformó por electroporación con el plasmidio pKD46 mediante la aplicación de un pulso de 1,8 KV (usando un electroporador “*E.coli*

Pulser” BioRad) a una mezcla, previamente incubada en hielo por 5 min, que contenía 80 µL de bacterias electrocompetentes y 5 µL del plasmidio purificado. pKD46 es un plasmidio termosensible que posee los genes que codifican las subunidades de la recombinasa Red del fago λ bajo el control de un promotor inducible por L-arabinosa (P_{BAD}) (Datsenko & Wanner, 2000).

Inmediatamente después de la electroporación, la suspensión de bacterias se recuperó agregando 900 µL de medio LB fresco e incubando a 30°C con agitación durante 60 min. Por último, las bacterias se sembraron sobre agar LB suplementado con Amp y se incubaron a 30°C por 24 h para seleccionar las colonias transformantes.

5.7.4.- Mutagénesis por intercambio alélico de productos PCR

Colonias de *S. Typhimurium* 14028s transformadas con el plasmidio pKD46 se cultivaron por 12 h en medio LB suplementado con Amp a 30°C con agitación. Las bacterias se subcultivaron a razón 1:100 en 20 mL de caldo LB fresco suplementado con Amp y se incubaron con agitación a la misma temperatura hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0,4–0,6, momento en que se adicionó L-arabinosa a una concentración final de 10 mM para inducir la expresión del sistema de recombinación Red, codificado en el plasmidio. Después de una incubación de 60 min a 30°C con agitación, se prepararon bacterias electrocompetentes (ver **Sección 5.8.3**).

Un volumen de 80 µL de la suspensión de bacterias electrocompetentes se mezcló con 20 µL de producto PCR (Kan^R) purificado. La mezcla se incubó por 5 min en hielo y luego la transformación se realizó por electroporación aplicando un pulso de 1,8 KV en un electroporador “*E.coli Pulser*” BioRad. Las bacterias se recuperaron inmediatamente en 1 mL de LB fresco, incubando a 37°C (temperatura de restricción para el plasmidio pKD46) con agitación durante 60 min. Las colonias mutantes se seleccionaron sembrando en agar LB suplementado con Kan e incubando a 37°C por 24 h.

5.7.5.- Comprobación de las colonias mutantes por PCR

El reemplazo alélico en cada mutante se verificó mediante PCR de colonias utilizando partidores que hibridan en regiones ubicadas río arriba y río abajo del sitio de reemplazo (Out5 y Out3, respectivamente). En el caso de la mutante $\Delta eptA$ se usó el partidor Out5 junto con el partidor K1, que hibrida dentro del gen de resistencia a kanamicina. En todos los casos se usó como DNA molde una suspensión de una colonia bacteriana en 200 μL de H_2O estéril y libre de nucleasas. La amplificación se realizó según el siguiente protocolo:

Mezcla de reacción		
Reactivo	Volumen (μL)	Concentración
Tampón PCR 5x	5	1x
MgCl_2 [25 mM]	2	2 mM
dNTPs 10x [10 mM]	0,5	0,2 mM
Partidor Out5 [10 μM]	0,5	0,2 μM
Partidor Out3 [10 μM]	0,5	0,2 μM
DNA (suspensión bacteriana)	1	-
GoTaq DNA polimerasa [5 U/ μL]	0,2	0,04 U/ μL
H_2O libre de nucleasas	15,3	-
Volumen final	25	

Programa de amplificación		
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (min:seg)	Ciclos
94	3:00	1
94	0:30	30
55	0:30	
72	2:00	
72	10:00	1
4	∞	-

La amplificación del fragmento se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TAE 1x y posterior tinción con solución GelRed. La corrida electroforética se efectuó a 100 V durante 30 min.

5.8.- Transducción de los alelos mutantes en *S. Typhimurium* 14028s

A fin de eliminar cualquier mutación secundaria que se pudiera haber generado durante la mutagénesis por *Red-swap*, el alelo mutante se movilizó mediante transducción generalizada desde el cromosoma de cada mutante generada hacia

un fondo genético WT de *S. Typhimurium* 14028s, utilizando el bacteriófago P22 HT105-1 *int*-201 (Maloy, 1990).

5.8.1.- Preparación de lisados de partículas transductantes

Cada cepa mutante se creció por 24 h en caldo LB suplementado con Kan a 37°C. Una mezcla de 200 µL del cultivo bacteriano y 1 mL de caldo de fago P22 (100 mL de LB suplementado con 0,1 mL de un lisado concentrado de fago P22 HT105-1 *int*-201, 2 mL de medio mínimo E 50x (MgSO₄·7H₂O 10 g/L, ácido cítrico monohidratado 100 g/L, K₂HPO₄·3H₂O 500 g/L y NaNH₄HPO₄·4H₂O 175 g/L), glucosa al 2% y esterilizado con gotas de cloroformo), se incubó a 37°C con agitación durante 8–16 h para permitir la infección de la cepa dadora. El lisado obtenido se esterilizó por adición de 100 µL de cloroformo y agitación vigorosa en Vórtex, seguido de lo cual se centrifugó a 18.300 x *g* por 1 min a temperatura ambiente. Finalmente, se recuperó el sobrenadante, se le agregó 50 µL de cloroformo y se almacenó a 4°C para su uso posterior.

5.8.2.- Transducción

Se cultivó *S. Typhimurium* 14028s durante 12 h en caldo LB a 37°C con agitación. La transducción se realizó mezclando 200 µL del cultivo de la cepa receptora con 20 µL del lisado de fago P22 obtenido previamente a partir de la cepa mutante. La mezcla se incubó a 37°C durante 30 min sin agitación para permitir la adsorción de las partículas transductantes y luego se centrifugó a 18.300 x *g*. El sedimento se resuspendió en 200 µL de caldo LB fresco y se incubó a 37° con agitación por 20 min para permitir la expresión fenotípica de la resistencia a Kan codificada en el alelo mutante transducido. Las colonias transductantes se seleccionaron preliminarmente sembrando la mezcla de transducción en agar LB suplementado con Kan e incubando a 37°C por 24 h.

5.8.3.- Comprobación y selección de transductantes

La correcta movilización del alelo mutante por transducción, se comprobó mediante PCR de colonias (ver **Sección 5.8.5**) escogidas aleatoriamente entre los clones resistentes a Kan. Posteriormente, para eliminar una posible contaminación con partículas remanentes del fago p22, las transductantes comprobadas por PCR se aislaron repetidamente en agar EBU (agar LB suplementado con K_2HPO_4 2,5 g/L, azul de Evans 12,5 mg/L, uranina 25 mg/L y glucosa 2 g/L) suplementado con Kan, hasta obtener colonias sin evidencia de lisis a causa de la infección por el fago P22 (colonias blancas). La ausencia del fago P22 en las transductantes aisladas se verificó evaluando su sensibilidad al bacteriófago lítico P22 H5 mediante un ensayo de *cross streaking*. En este ensayo, las colonias a analizar se sembraron cruzando en forma perpendicular una línea previamente trazada con 30 μ L de lisado del fago P22 H5 sobre la superficie de una placa de agar EBU suplementado con Kan, la cual fue incubada a 37°C durante 24 h. Finalmente, se respaldaron aquellas transductantes libres de fago P22, identificadas al resultar interrumpido su crecimiento por presencia del fago P22 H5.

5.9.- Ensayo de sensibilidad a polimixina B

Se realizó el ensayo de sensibilidad a polimixina B según el procedimiento descrito por Lee (Lee *et al.*, 2004), con modificaciones. Un cultivo de *S. Typhimurium* 14028s, o de las distintas mutantes en estudio, crecido por 12 h en caldo LB a 37°C con agitación, fue lavado una vez con medio mínimo N y resuspendido en el mismo medio. Posterior a esto, se inoculó 50 μ L del cultivo lavado en 5 mL de medio mínimo N y se incubó con agitación a 37°C hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0,3-0,4. Luego, se realizó una dilución 1:100 del cultivo en medio LB, llegando a un volumen final de 1 mL. En una placa de 96 pocillos, se mezcló alícuotas de 50 μ L de cada suspensión bacteriana con 50 μ L de distintas concentraciones de polimixina B, diluidas en PBS. Estas suspensiones se incubaron durante 1 h con agitación a 37°C. Finalmente, desde cada pocillo se realizaron diluciones seriada en PBS, las que se sembraron en agar LB. Luego de incubar a 37°C durante toda la noche, se

determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC) y se calculó la supervivencia relativa con respecto a las bacterias no expuestas a polimixina, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Supervivencia relativa} = \frac{\text{UFC tratadas con polimixina B}}{\text{UFC tratadas con PBS}}$$

5.10.- Ensayo de infección por competencia en *D. discoideum*

El ensayo utilizado se basó en un ensayo de infección desarrollado en nuestro laboratorio (Urrutia *et al.*, 2018), con adaptaciones. En primer lugar, cada cepa mutante a evaluar y la cepa WT se cultivaron durante 12 h con agitación a 37°C en medio LB y se lavaron una vez con tampón Soerensen (2 g/L KH₂PO₄, 0,36 g/L Na₂HPO₄ x 2H₂O, pH 6,0), luego de lo cual se resuspendieron en el mismo tampón a una concentración de 1 x 10⁷ bacterias/mL. En paralelo, un cultivo axénico de *D. discoideum* (cepa AX2 o AX2 ApID⁻), crecido hasta fase exponencial, fue lavado dos veces con tampón Soerensen, teñido con azul de tripán y titulado mediante recuento en una cámara de Neubauer. Así, se preparó una suspensión que contenía ~1 x 10⁶ amebas/mL en tampón Soerensen. En paralelo se prepararon dos tubos eppendorf de 1,7 mL de una mezcla 1:1 de la cepa mutante y la cepa WT en 100 µL de tampón Soerensen. Uno de los tubos se utilizó para monitorear la viabilidad de las amebas y el otro para hacer diluciones seriadas y posterior siembra en placa. Luego se mezclaron las soluciones *D. discoideum* y *S. Typhimurium* obteniendo una multiplicidad de infección (MOI) de ~100 bacterias/ameba.

La mezcla fue centrifugada a 9.200 x *g* durante 20 s, para promover la interacción de las bacterias con las amebas, y luego incubada a 22°C durante 1 h sin agitación, siendo considerado como tiempo 0 h. Luego de la incubación, todas las mezclas se lavaron una vez con tampón Soerensen suplementado con gentamicina (40 µg/mL) para eliminar las bacterias extracelulares. Posteriormente, las amebas infectadas se lavaron dos veces con tampón Soerensen para remover el antibiótico y finalmente fueron resuspendidas en 200 µL de tampón Soerensen. Alícuotas de la

suspensión de amebas infectadas fueron obtenidas a 0, 1, 3 y 6 h post infección. Las amebas viables se determinaron a cada tiempo mediante tinción con azul de tripán y posterior recuento en una cámara de Neubauer. Además, las amebas infectadas recuperadas a cada tiempo fueron lavadas una vez con tampón Soerensen suplementado con gentamicina (40 µg/mL), dos veces con tampón Soerensen para remover el antibiótico y luego lisadas con Triton X-100 al 0,2%. Para la determinación de los títulos de las bacterias intracelulares se prepararon diluciones seriadas, las que se sembraron en agar LB y agar LB suplementado con Kan. Las UFC de cada mutante se expresaron como valores relativos a las UFC de la cepa WT en cada tiempo de infección (0 y 1, 3 y 6 h). De esta manera, se calculó el Índice de Competencia (IC) para la internalización y la supervivencia de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$IC = \frac{\left(\frac{UFC_{mutante}}{UFC_{silvestre}}\right)_{Final}}{\left(\frac{UFC_{mutante}}{UFC_{silvestre}}\right)_{Inicial}}$$

El IC para la internalización se calculó considerando como razón de UFC inicial a las bacterias presentes en el inóculo y como razón de UFC final a las bacterias intracelulares recuperadas al tiempo 0 h. Para el IC de la supervivencia intracelular se consideró como razón de UFC inicial a las bacterias recuperadas al tiempo 0 h y como razón final a las bacterias intracelulares recuperadas a los tiempos 1, 3 y 6 h post infección. Finalmente, los valores de IC fueron expresados como logaritmo en base 10 (Log_{10}) y se interpretaron de acuerdo con los siguientes criterios:

- $\text{Log}_{10}(\text{IC}) < 0$, indica que la cepa mutante sobrevive/invade menos que la cepa WT.
- $\text{Log}_{10}(\text{IC}) = 0$, indica que la cepa mutante sobrevive/invade igual que la cepa WT.
- $\text{Log}_{10}(\text{IC}) > 0$, indica que la cepa mutante sobrevive/invade más que la cepa WT.

5.11.- Análisis estadístico y expresión de resultados

Los datos obtenidos desde los experimentos corresponden al promedio de 3 réplicas biológicas independientes. En todos los gráficos, las barras de error representan el error estándar del promedio. La significancia estadística en el ensayo de sensibilidad a polimixina B se determinó a través de la prueba ANOVA de dos vías y la prueba de comparaciones múltiples Sidak con un intervalo de confianza mínimo del 95%, considerando estadísticamente significativos a valores $P < 0,05$. Para los ensayos de infección por competencia e internalización se aplicó la prueba estadística *One Sample t-test* con un intervalo de confianza mínimo del 95%, considerando estadísticamente significativos a valores $P < 0,05$. Todo el análisis estadístico de los datos y la elaboración de los gráficos correspondientes se realizó con el programa *GraphPad Prism 8.0* (GraphPad Software Inc.).

6.- RESULTADOS

6.1.- Efecto de la delección de los genes *arnBCADTEF*, *eptA*, *waaL*, *lpxO*, *lpxR* y *pagP* de *S. Typhimurium* en la susceptibilidad a polimixina B

Se ha descrito que los genes *arnBCADTEF*, *eptA*, *waaL*, *lpxO*, *lpxR* y *pagP*, que codifican enzimas que modifican la estructura del LPS, se relacionan con la resistencia de distintas bacterias frente a péptidos antimicrobianos (Trent *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 1998; Llobet *et al.*, 2015). Con la finalidad de conocer si los genes mencionados influyen en la susceptibilidad de *S. Typhimurium* al péptido antimicrobiano polimixina B, se generaron mutantes por delección de estos genes mediante el método de *Red-swap* en *S. Typhimurium* 14028s. En estas mutantes se reemplazó el gen de interés por un *cassette* de resistencia a kanamicina (ver **Sección 5.8**). Luego de la construcción de las mutantes y su confirmación por PCR, se realizó el ensayo de sensibilidad a polimixina B, péptido utilizado en muchos trabajos para evaluar la sensibilidad a péptidos antimicrobianos. Preliminarmente, para confirmar este efecto, se realizó un ensayo de susceptibilidad a polimixina B de la cepa WT, crecida en condiciones inductoras o no inductoras de PhoP/PhoQ (**Figura 5**).

Como se esperaba, en la **Figura 5** se puede observar una mayor supervivencia relativa frente a polimixina B (1 y 2 µg/mL) al crecer las bacterias en un medio inductor del sistema PhoP/PhoQ que al crecerlas en un medio no inductor. Sin embargo, al utilizar una concentración relativamente alta del antibiótico (5 µg/mL) las bacterias no sobreviven independiente de la condición de cultivo. Esto indica que bajo la condición inductora del sistema PhoP/PhoQ se activarían los genes que promueven la resistencia de la bacteria a polimixina B. En consecuencia, se decidió utilizar este medio para cultivar las bacterias que se evaluaron en los ensayos que se describen a continuación.

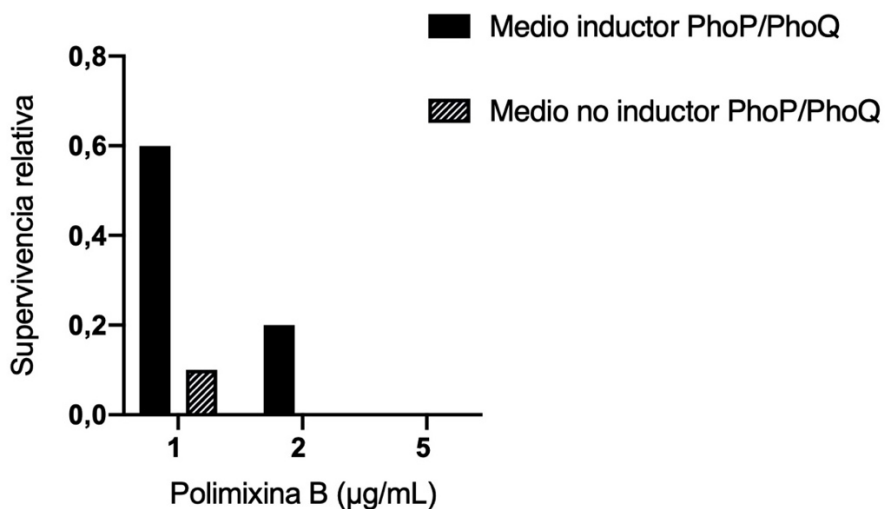


Figura 5. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la susceptibilidad de *S. Typhimurium* a polimixina B. Se muestran los valores de supervivencia relativa de la cepa WT de *S. Typhimurium* respecto a la condición sin tratamiento.

En la **Figura 6** se muestra la supervivencia relativa de las mutantes generadas frente a 3 concentraciones de polimixina B. Las cepas $\Delta lpxO$, $\Delta lpxR$, $\Delta pagP$ y $\Delta eptA$ son igual de susceptibles que la cepa WT a todas las concentraciones utilizadas de polimixina B, luego de una hora de exposición al antibiótico (**Figura 6C, 6D, 6E y 6F**, respectivamente). Por el contrario, la cepa $\Delta waaL$ es más susceptible que la cepa WT a la concentración 2 µg/mL, luego de una hora de exposición (**Figura 6B**). Por último, la cepa que carece del operón *arnBCADTEF*, que codifica las enzimas necesarias para sintetizar e incorporar un grupo L-Ara4N en uno de los grupos fosfato del lípido A, es más susceptible a polimixina B que la cepa WT a concentraciones de 1 µg/mL y 2 µg/mL (**Figura 6A**). Cabe destacar que a la concentración 5 µg/mL todas las cepas de *S. Typhimurium* fueron susceptibles a polimixina B, no encontrando diferencias entre la cepa WT y las cepas mutantes, a pesar de que se cultivaron en las mismas condiciones que en la otras concentraciones (**Figura 6**).

En conjunto, estos resultados demuestran que los genes *waaL* y *arnBCADTEF* son necesarios para la supervivencia de *S. Typhimurium* frente al péptido antimicrobiano polimixina B. Esto sugiere que un AgO completo y la adición de L- Ara4N a los grupos fosfatos del lípido A de la bacteria participan en este proceso.

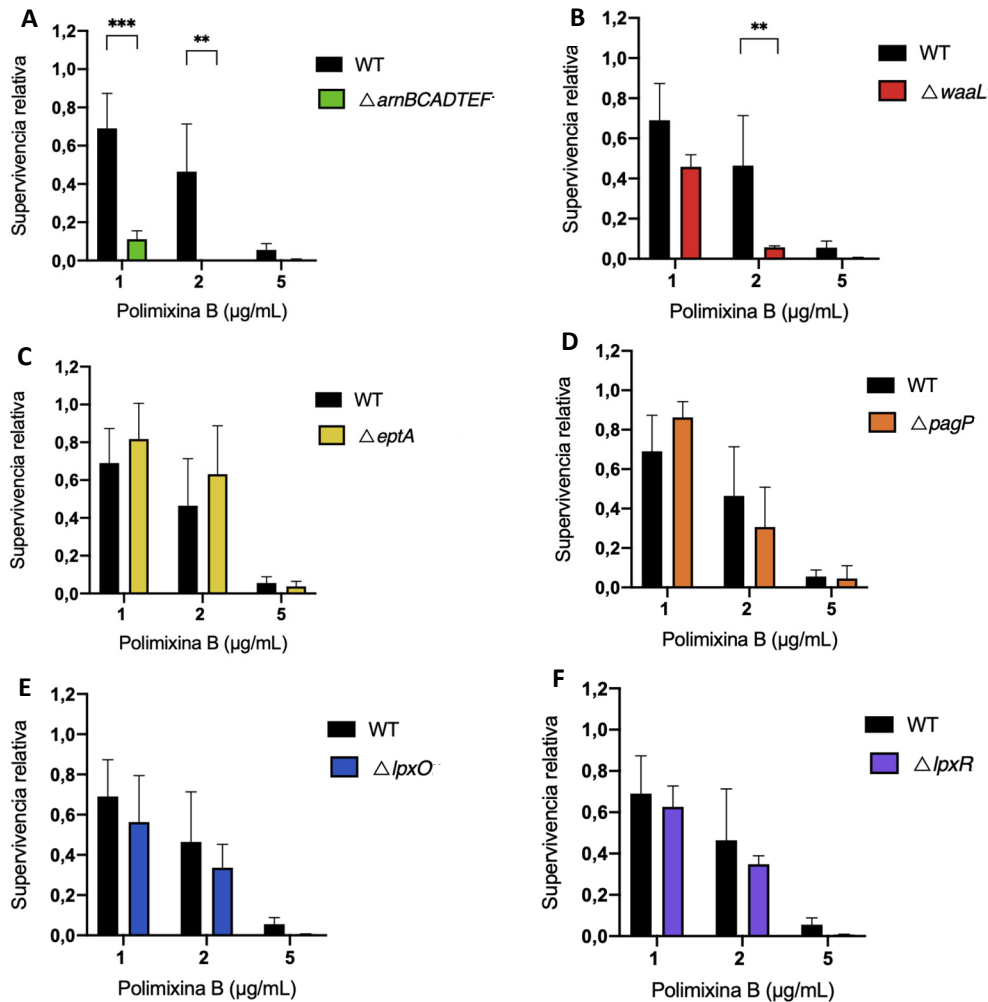


Figura 6. Supervivencia de la cepa WT y las cepas mutantes de *S. Typhimurium* en estudio frente a polimixina B. Se muestran los valores de supervivencia relativa de cada cepa mutante de *S. Typhimurium* analizada (**A**: $\Delta amBCADTEF$; **B**: $\Delta waaL$; **C**: $\Delta eptA$; **D**: $\Delta pagP$; **E**: $\Delta lpxO$; **F**: $\Delta lpxR$) respecto a la condición sin tratamiento. Los valores graficados corresponden al promedio de 3 réplicas biológicas y su error estándar. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó un ANOVA de dos vías y la prueba de Sidak (** = $P < 0,005$ y *** = $P < 0,0005$).

6.2.- Contribución de los genes *arnBCADTEF*, *eptA*, *waaL*, *lpxO*, *lpxR* y *pagP* en la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*

Las amebas se alimentan de bacterias que se encuentran en el ambiente, utilizando mecanismos similares a los establecidos en macrófagos (Steinert *et al.*, 2003; Cosson & Lima, 2014). Previamente, en nuestro laboratorio determinamos que los genes *eptA*, *arnBCADTEF*, *lpxO*, *lpxR* y *pagP* son necesarios para la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en macrófagos murinos *in vitro* (Sabag, 2017). Para evaluar si estos genes son requeridos para la supervivencia intracelular de la bacteria en *D. discoideum*, se realizó un ensayo de infección por competencia en la ameba. En este ensayo se infectó la ameba con la mezcla 1:1 de la cepa WT y cada mutante a evaluar y luego de 1, 3 y 6 h post infección se recuperaron las bacterias intracelulares y se titularon para determinar los IC. Dentro de este ensayo se incluyó la cepa $\Delta aroA$ de *S. Typhimurium*, ya que se conoce que esta mutante presenta deficiencia en la supervivencia intracelular en *D. discoideum* (Riquelme *et al.*, 2016), por lo que se utilizó como control interno del ensayo.

Los resultados de los ensayos de infección por competencia muestran que a 1 h post infección sólo la cepa $\Delta arnBCADTEF$ presentó deficiencias en la supervivencia intracelular en la ameba *D. discoideum* AX2, siendo esta diferencia significativa con respecto a la cepa WT (**Figura 7A**). En este mismo tiempo las cepas $\Delta waaL$, $\Delta eptA$, $\Delta lpxO$, $\Delta lpxR$ y $\Delta pagP$ si bien mostraron un Log_{10}IC negativo, su supervivencia no resultó significativamente diferente que la de la cepa WT. A las 3 h post infección ninguna de las mutantes presentó diferencias significativas en su supervivencia intracelular con respecto a la cepa WT, aunque sus Log_{10}IC fueron negativos (**Figura 7B**). Por último, a las 6 h post infección las cepas $\Delta eptA$ y $\Delta lpxR$ presentaron una supervivencia intracelular significativamente menor en comparación a la cepa WT (**Figura 7C**). La cepa $\Delta aroA$ fue utilizada como un control, y se puede observar que a todos los tiempos post infección presenta una deficiencia en la supervivencia intracelular.

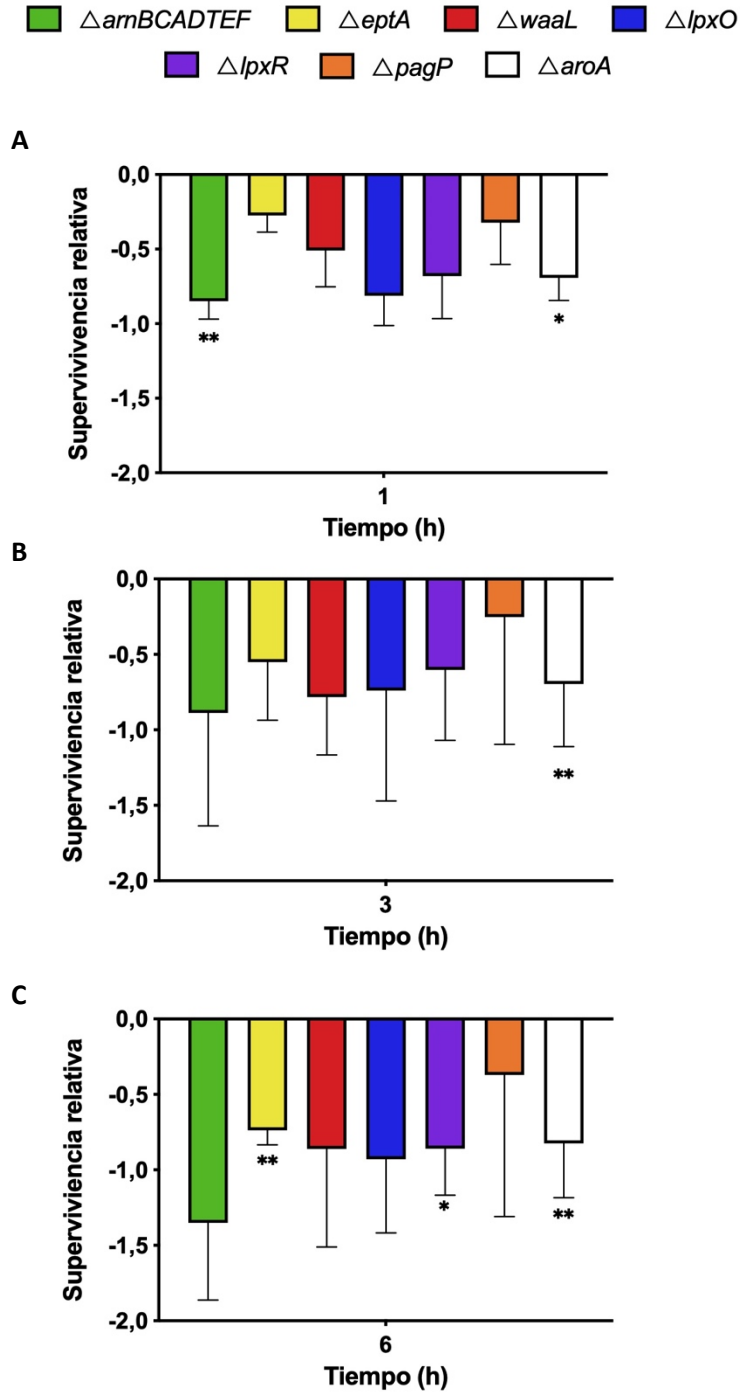


Figura 7. Ensayos de infección por competencia *in vitro* entre la cepa WT y las cepas mutantes de *S. Typhimurium* en *D. discoideum* AX2. Se muestran los valores de supervivencia relativa de las distintas cepas mutantes de *S. Typhimurium* respecto a la cepa WT, calculados como: $(CFU_{mutante}/CFU_{WT})_{Tx} / (CFU_{mutante}/CFU_{WT})_{T0}$ y expresados como Log_{10} . T_x corresponde a 1 h (**A**), 3 h (**B**) o 6 h (**C**) post infección. Los valores graficados corresponden al promedio de 3 réplicas biológicas y su error estándar. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó la prueba *One sample t-test* (* = $P < 0,05$ y ** = $P < 0,005$).

Para confirmar que las diferencias observadas (**Figura 7**) se deben a la menor supervivencia intracelular de las cepas mutantes y no a un defecto en su internalización, se determinó la internalización relativa de cada cepa mediante el cálculo del IC. Como se puede observar en la **Figura 8**, ninguna de las mutantes estudiadas presentó diferencias significativas en la internalización con respecto a la cepa WT.

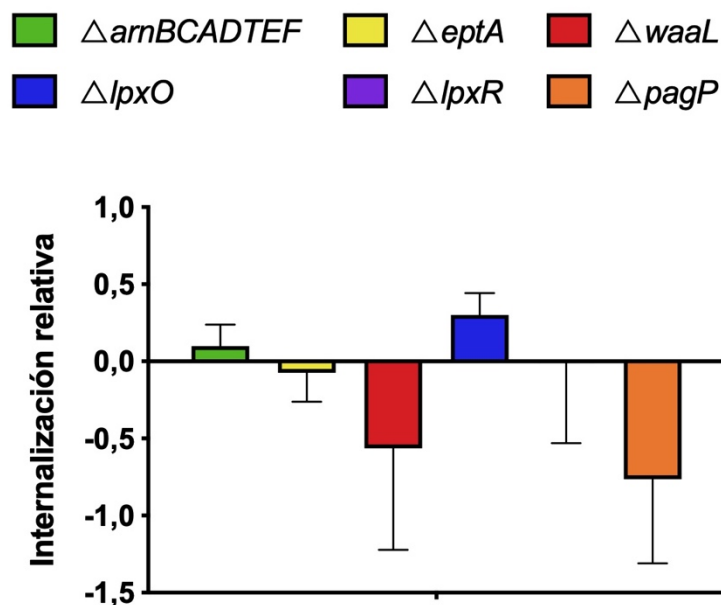


Figura 8. Internalización de las cepas de *S. Typhimurium* en estudio en *D. discoideum* AX2. Se muestran los valores de internalización relativa de las distintas cepas mutantes de *S. Typhimurium* analizadas respecto a la cepa WT, calculados como: $(CFU_{mutante}/CFU_{WT})_{T0} / (CFU_{mutante}/CFU_{WT})_{in\acute{o}culo}$ y expresada como Log_{10} . Los valores graficados corresponden al promedio de 3 réplicas biológicas y su error estándar. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó la prueba *One sample t-test*.

En conjunto, estos resultados demuestran que los genes *arnBCADTEF*, *eptA* y *lpxR* son requeridos para la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*. Esto sugiere que la adición de L-Ara4N y pEtN a grupos fosforilos del lípido A y un lípido A tetraacilado de *S. Typhimurium* son necesarias para sobrevivir dentro de la ameba.

6.3.- Contribución de los genes *arnBCADTEF*, *eptA*, *waaL*, *lpxO*, *lpxR* y *pagP* en la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en una cepa de *D. discoideum* que carece del amebaporo AplD

Se ha descrito que las amebas producen péptidos antimicrobianos, llamados amebaporos, que cumplen funciones similares a los producidos por macrófagos (Leippe, 1999). De hecho, el amebaporo AplD producido por *D. discoideum* ha demostrado tener efecto bactericida tanto en bacterias Gram positivo como en bacterias Gram negativo (Dhakshinamoorthy *et al.*, 2018). Con esto en mente, en esta tesis se evaluó la supervivencia intracelular de las mutantes de *S. Typhimurium* analizadas en los objetivos anteriores mediante un ensayo de infección por competencia entre cepas que carecen de los genes mencionados y la cepa WT en una cepa derivada de *D. discoideum* AX2 que carece del amebaporo AplD.

Los resultados de los ensayos de infección por competencia muestran que a 1 hora post infección sólo la cepa $\Delta waaL$ presentó deficiencias en la supervivencia intracelular en la ameba *D. discoideum* AX2 AplD⁻, siendo esta diferencia significativa con respecto a la cepa WT (**Figura 9B**). En este mismo tiempo las cepas $\Delta arnBCATDEF$, $\Delta eptA$, $\Delta lpxO$, $\Delta lpxR$ y $\Delta pagP$ no muestran una supervivencia significativamente menor con respecto a la cepa WT, a pesar de que se obtuvo un Log₁₀IC negativo. A las 3 h post infección las cepas $\Delta lpxO$ y $\Delta lpxR$ presentaron deficiencias en la supervivencia intracelular en la cepa *D. discoideum* AX2 AplD⁻, esta deficiencia es estadísticamente significativa con respecto a la cepa WT (**Figuras 9E y 9F**). El resto de las mutantes a este tiempo post infección no presentaron ninguna diferencia en la supervivencia intracelular en comparación con la cepa WT. Por último, a las 6 h post infección la cepa $\Delta waaL$ y $\Delta lpxR$ mostraron deficiencias en la supervivencia con respecto a la cepa WT, en la cepa de *D. discoideum* que carece del péptido AplD. El resto de las mutantes, $\Delta arnBCATDEF$, $\Delta eptA$, $\Delta lpxO$ y $\Delta pagP$ no presentaron diferencias con respecto a la cepa WT a este tiempo post infección.

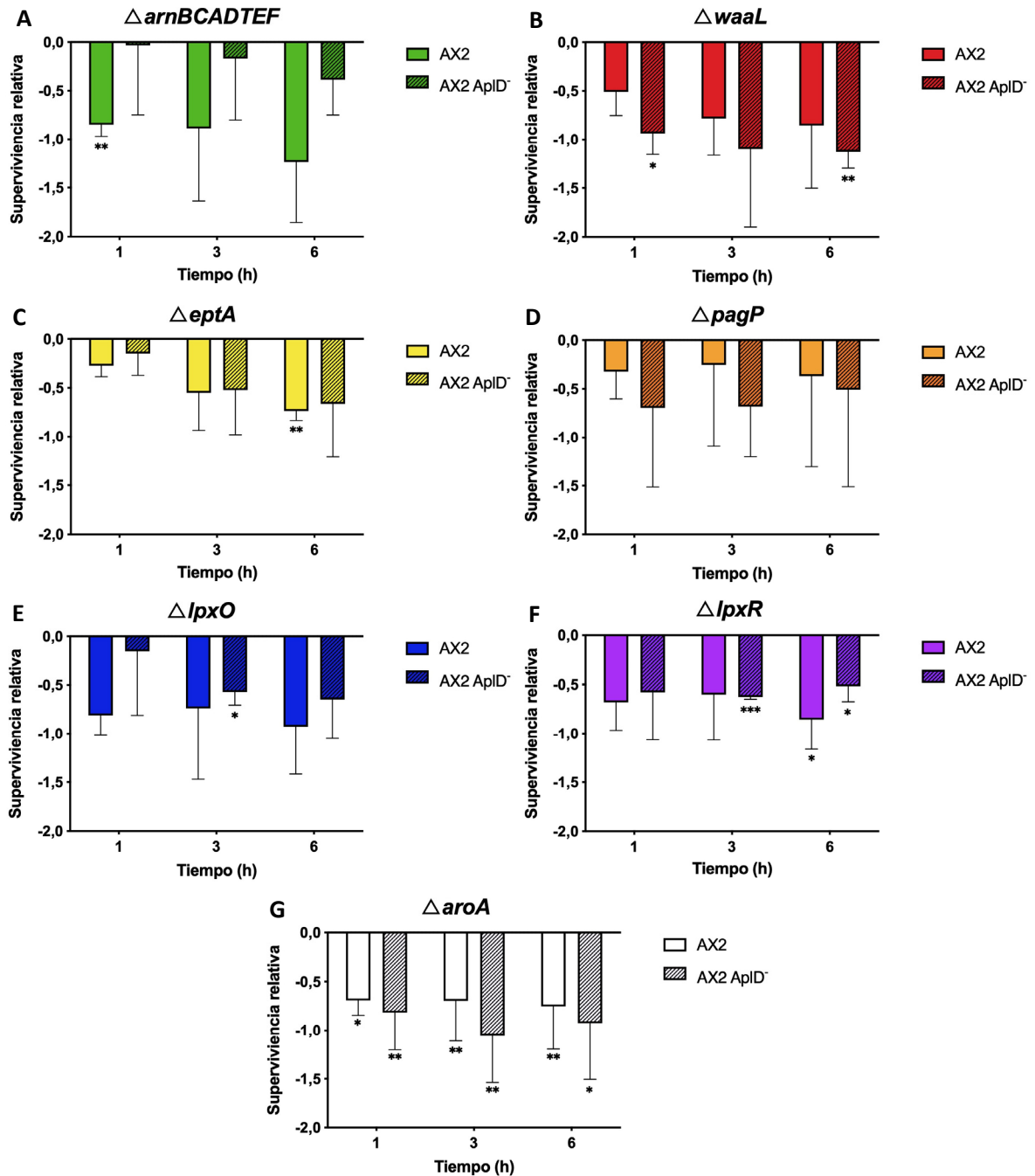


Figura 9. Ensayos de infección por competencia *in vitro* entre la cepa WT y las cepas mutantes de *S. Typhimurium* en *D. discoideum* AX2 y AX2 AplD⁻. Se muestran los valores de supervivencia relativa de las distintas cepas mutantes de *S. Typhimurium* analizadas (**A:** $\Delta arnBCADTEF$; **B:** $\Delta waaL$; **C:** $\Delta eptA$; **D:** $\Delta pagP$; **E:** $\Delta lpxO$; **F:** $\Delta lpxR$; **G:** $\Delta aroA$) respecto a la cepa WT, calculados como: $(CFU_{mutante}/CFU_{WT})_{Tx} / (CFU_{mutante}/CFU_{WT})_{T0}$ y expresada como \log_{10} . Tx corresponde a 1, 3 o 6 h post infección. Los valores graficados corresponden al promedio de 3 réplicas biológicas y su error estándar. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó la prueba *One sample t-test* (* = $P < 0,05$ y ** = $P < 0,005$)

Al igual que en el objetivo anterior, la cepa $\Delta aroA$ fue utilizada como un control dentro de la cepa *D. discoideum* AX2 ApID^- (**Figura 9G**). Esto debido a que los defectos de esta mutante en el metabolismo la hace incapaz de sobrevivir en cualquier cepa de la ameba (Riquelme *et al.*, 2016). Se puede observar que esta mutante presenta una supervivencia intracelular estadísticamente menor que la cepa WT a todos los tiempos post infección.

Para confirmar que las diferencias observadas en el ensayo (**Figura 9**) se deben a la menor supervivencia intracelular de las cepas mutantes y no a un defecto en su internalización, se determinó la internalización relativa de cada cepa mediante el cálculo del IC. Como se puede observar en la **Figura 10**, ninguna de las mutantes estudiadas presentó diferencias significativas en la internalización con respecto a la cepa WT. Tampoco existen diferencias en la internalización entre las cepas de *D. discoideum*, ambas cepas internalizan a *Salmonella* de la misma forma.

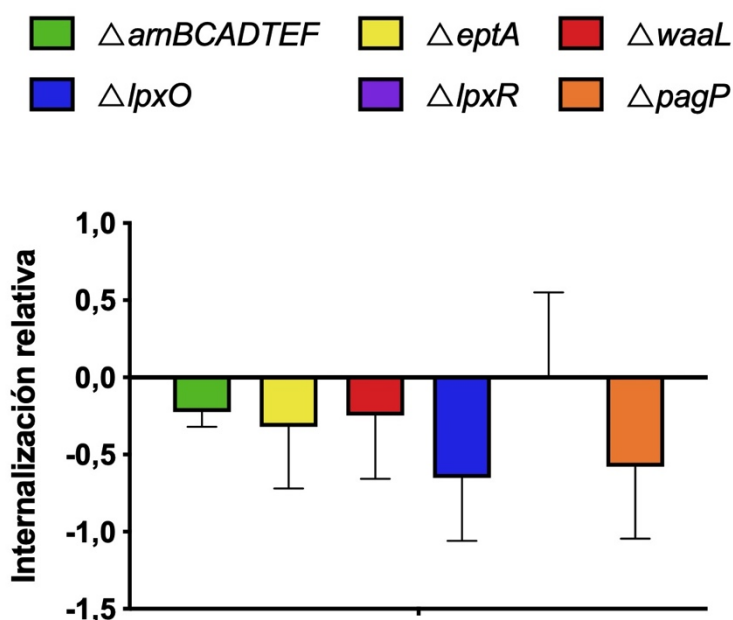


Figura 10. Internalización de las cepas de *S. Typhimurium* en estudio en *D. discoideum* AX2 ApID^- . Se muestran los valores de internalización relativa de las distintas cepas mutantes de *S. Typhimurium* analizadas respecto a la cepa WT, calculados como: $(CFU_{mutante}/CFU_{WT})_{T0} / (CFU_{mutante}/CFU_{WT})_{in\acute{o}culo}$ y expresada como Log_{10} . Los valores graficados corresponden al promedio de 3 réplicas biológicas y su error estándar. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó la prueba *One sample t-test*.

Los resultados del ensayo no muestran diferencias significativas en la supervivencia intracelular de las cepas mutantes de *S. Typhimurium* entre *D. discoideum* AX2 y AX2 AplD⁻ en ningún tiempo estudiado (**Figura 9**). A pesar de esto, la cepa $\Delta arnBCADTEF$ al tiempo 1 h se comporta distinto en la cepa de *Dictyostelium* sin el amebaporo AplD, ya que en dicha cepa no se observan diferencias en la supervivencia intracelular entre la cepa mutante y la cepa WT; diferencia que sí se observa en la cepa AX2 (**Figura 9A**). Algo similar ocurre en la cepa $\Delta eptA$ a las 6 h post infección, ya que la disminución en la supervivencia intracelular de la cepa mutante con respecto a la cepa WT en *D. discoideum* AX2, no se observa en *D. discoideum* AX2 AplD⁻ (**Figura 9C**). Por otro lado, luego de 1 h y 6 h post infección la cepa $\Delta waaL$ presenta una disminución en la supervivencia intracelular con respecto a la cepa WT en *D. discoideum* AX2 AplD⁻ (**Figura 9B**), fenómeno que no se observa en *D. discoideum* AX2. A las 3 h post infección, las cepas $\Delta lpxO$ y $\Delta lpxR$ muestran una disminución en la supervivencia intracelular en comparación a la cepa WT en *D. discoideum* AX2 AplD⁻ (**Figuras 9E y 9F**), comportamiento que no se observa en este tiempo de infección en *D. discoideum* AX2. Por último, al tiempo 6 h la cepa $\Delta lpxR$ presenta deficiencia en la supervivencia intracelular con respecto a la cepa WT tanto en la en la ameba que carece del amebaporo AplD como en la cepa de *D. discoideum* AX2 (**Figura 9F**).

En conjunto, estos resultados indican que los genes *arnBCADTEF* y *eptA* no son requeridos para la supervivencia intracelular de la bacteria cuando *D. discoideum* carece del amebaporo AplD.

7.- DISCUSIÓN

El LPS es el componente principal de la membrana externa de las bacterias Gram negativo, por lo que también es un importante mediador de las interacciones con el hospedero durante la infección. El LPS es una molécula dinámica, capaz de modificar algunas de sus características en respuesta a las condiciones ambientales que detectan las bacterias (Rietschel *et al.*, 1994; Raetz *et al.*, 2007). Dentro de las modificaciones que puede sufrir el LPS en respuesta a las condiciones ambientales, están las modificaciones del lípido A, que son las más estudiadas debido al impacto de esta estructura sobre la virulencia y supervivencia intracelular en diversas bacterias (Gunn & Miller 1996). Estas modificaciones se pueden clasificar en dos tipos: las modificaciones covalentes sobre los grupos fosforilo del lípido A y las modificaciones sobre las cadenas aciladas que presenta esta molécula. Las primeras tienen el objetivo de enmascarar las cargas negativas de los grupos fosfato, lo que confiere a las bacterias una mayor resistencia a CAMPs (Guo *et al.*, 1997; Raetz *et al.*, 2007). Este es un mecanismo conservado utilizado por muchos patógenos bacterianos, como *S. Typhimurium*, *K. pneumoniae* y *H. pylori*, entre otros, para permitir su supervivencia dentro del organismo hospedero (Gunn *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2004; Moskowitz *et al.*, 2004; Tran *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007; Marr *et al.*, 2008). Por otra parte, las modificaciones a nivel de las cadenas del lípido A pueden ser hidroxilaciones, desacilaciones o acilaciones secundarias de la molécula. Estos cambios también ayudan a evitar el paso de péptidos antimicrobianos hacia la membrana plasmática, debido a que disminuyen la permeabilidad de la membrana externa (Guo *et al.*, 1998). También, se ha estudiado la influencia del LPS completo sobre la resistencia de las bacterias frente a CAMPs. En particular, la presencia del antígeno O ha demostrado ser una barrera protectora importante y necesaria para la supervivencia de la bacteria, ya que oculta la carga negativa de los grupos fosforilo del lípido A (Matamouros & Miller, 2015). En el caso particular de *Salmonella*, varias de estas modificaciones sobre el lípido A son reguladas por factores ambientales (Haraga *et al.*, 2008). En este contexto, se ha

descrito en la literatura que la expresión de varios de los genes que codifican las enzimas modificadoras del lípido A es regulada directa (*lpxO* y *pagP*) o indirectamente (*lpxR*, *arnBCADTEF* y *eptA*) por el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ (Gunn *et al.*, 2008), sistema que es activado cuando la bacteria se encuentra en un ambiente a pH medianamente ácido y/o en presencia de bajas concentraciones de cationes divalentes, como cuando la bacteria ingresa a las células hospedero (Simpson & Trent, 2019).

En el ambiente, *Salmonella* interacciona con una amplia variedad de organismos, incluyendo bacterias, plantas, hongos y protozoos. Dentro de los protozoos encontramos a las amebas, que corresponden a células eucariontes unicelulares que viven en suelos de bosques y que se alimentan de bacterias y hongos unicelulares mediante mecanismos de fagocitosis similares a los utilizados por células fagocíticas profesionales de mamíferos. Sin embargo, algunas bacterias, como *L. pneumophila* y especies de *Mycobacterium*, logran sobrevivir en el interior de estos protozoos, para lo cual utilizan mecanismos moleculares similares a los descritos para sobrevivir dentro de macrófagos murinos (Salah *et al.*, 2009; Escoll *et al.*, 2013). Es por esto que nos propusimos estudiar algunos genes que codifican enzimas relacionadas con modificaciones del LPS, los cuales confieren a *S. Typhimurium* resistencia a péptidos antimicrobianos en células fagocíticas de mamíferos, para evaluar si éstos son requeridos para la supervivencia de la bacteria en amebas ambientales, utilizando a *D. discoideum* como modelo de estudio. Esta ameba presenta un arsenal de moléculas que utiliza para eliminar tanto Gram positivo como Gram negativo bacterias, llamadas amebaporos (Dhakshinamoorthy *et al.*, 2018). Entre ellos se describió el amebaporo AplD, necesario para degradar bacterias Gram negativo. Por esto, en esta tesis se determinó la contribución del operón *arnBCADTEF* y los genes *eptA*, *waaL*, *lpxO*, *lpxR* y *pagP* en la supervivencia de *Salmonella* frente al péptido catiónico antimicrobiano polimixina B, y luego se evaluó la supervivencia intracelular de la bacteria en una cepa de *D. discoideum* que carece del amebaporo AplD.

7.1 Contribución de los genes *arnBCADTEF*, *eptA*, *waaL*, *lpxO*, *lpxR* y *pagP* en la resistencia de *S. Typhimurium* al péptido antimicrobiano polimixina B

La polimixina B es un péptido antimicrobiano catiónico de estructura cíclica, utilizado en el último tiempo para evaluar la resistencia de las bacterias a péptidos antimicrobianos (Mohaprata *et al.*, 2021). Los genes objeto de esta investigación han sido ampliamente investigados y caracterizados por su participación en la resistencia a diferentes péptidos catiónicos antimicrobianos. Por ejemplo, mutantes de *S. Typhimurium* carentes del gen *eptA* o del operón *arnBCADTEF*, que codifican enzimas que neutralizan la carga negativa de los grupos fosforilo del lípido A mediante la adición de un grupo fosfoetanolamina y un grupo L-Ara4N, respectivamente, son susceptibles a CAMPs (Lee *et al.*, 2004). En este estudio se observó que la cepa Δ *arnBCADTEF* sobrevivió significativamente menos que la cepa WT (**Figura 6A**), incluso a bajas concentraciones de polimixina B, lo que se condice con lo descrito por Lee *et al.*, (2004). Por otra parte, a la concentración más alta utilizada (5 μ g/mL) en esta tesis no se observó diferencias en la susceptibilidad a polimixina B entre la cepa Δ *eptA* y su cepa parental, similar a lo descrito por Lee *et al.*, (2004). De hecho, la viabilidad de la cepa mutante y la cepa WT fue afectada de igual forma por el antibiótico (**Figura 6C**). Cabe mencionar que, en el trabajo realizado por Lee se describe que la mutante Δ *eptA* fue significativamente más sensible que la cepa WT a la concentración de 10 μ g/mL de polimixina B. Sin embargo, en nuestros ensayos no fue posible comparar la susceptibilidad de esta mutante a esa concentración, debido a que tanto cepa WT como la cepa Δ *eptA* presentaron dificultades para crecer en estas condiciones. Se ha evidenciado en estudios previos, que el aporte de la expresión del operón *arnBCADTEF*; por sí solo tiene la capacidad de enmascarar la carga negativa del lípido A por la adición del grupo L-Ara4N al lípido A (Tamayo *et al.*, 2005). Lo anterior, explicaría por qué sería necesaria una concentración mayor de polimixina B para producir efectos en la supervivencia de la mutante Δ *eptA*. Por otro lado, en este estudio se comprobó que la presencia del antígeno O es necesaria también para que *Salmonella* logre sobrevivir a polimixina B, estudio que no se había realizado con anterioridad. Cabe mencionar que nuestro resultado concuerda con un estudio en el que se definió que

el antígeno O es necesario para la supervivencia de la *Salmonella* frente a colistina (Ricci *et al.*, 2020).

Las cepas $\Delta lpxO$ y $\Delta pagP$ han sido descritas en distintos trabajos como susceptibles a péptidos antimicrobianos debido a los cambios de permeabilidad que produce la ausencia de las enzimas codificadas por estos genes (Bartholomew *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 1998). La cepa $\Delta lpxO$ se describió como más sensible a péptidos antimicrobianos distintos a polimixina B, tanto en *Salmonella* como en *A. baumannii* (Murata *et al.*, 2007; Bartholomew *et al.*, 2019), debido a que la adición del grupo hidroxilo a las cadenas aciladas del lípido A por la enzima LpxO contribuye a disminuir la permeabilidad de la envoltura bacteriana ya que la presencia de este grupo funcional aumenta la interacción entre las cadenas aciladas del lípido A (Nobre *et al.*, 2015). Sin embargo, en los resultados obtenidos en esta tesis en la cepa $\Delta lpxO$, se puede observar que frente al péptido antimicrobiano polimixina B, la cepa mutante, sobrevivió de la misma forma que la cepa WT a las distintas concentraciones de polimixina B (**Figura 6E**). Esta nula diferencia en la susceptibilidad entre la cepa WT y la cepa $\Delta lpxO$ ocurre a pesar de que la cepa mutante posee un lípido A más permeable, siendo más sencillo que el péptido pudiera atravesar la membrana externa. De la misma forma que el gen *lpxO*, *pagP* codifica una enzima que ayuda a disminuir la permeabilidad de la membrana externa, agregando cadenas aciladas al lípido A, aumentando la interacción entre ellas. Esto permite formar una barrera difícil de atravesar para las moléculas externas (Guo *et al.*, 1998). Así, al estar ausente este gen en la cepa mutante $\Delta pagP$, se esperaría que la membrana externa perdiera rigidez y aumentara su permeabilidad, facilitando el paso del AMP. Consecuentemente, el trabajo de Guo en 1998 muestra que al estar deletado este gen, la cepa mutante $\Delta pagP$ sobrevive menos que la cepa WT de *Salmonella* Typhimurium frente a los péptidos antimicrobianos C18G y pGLa. Sin embargo, estos resultados no se condicen con los obtenidos en esta tesis, ya que, la cepa $\Delta pagP$ sobrevive de la misma forma que la cepa WT frente a polimixina B. Los resultados obtenidos en esta cepa podría deberse a la utilización de un péptido antimicrobiano con características

fisicoquímicas distintas a los utilizados en los trabajos en los que se encontraron diferencias con respecto a la cepa WT (Guo *et al.*, 1998).

Finalmente, se ha descrito que una cepa $\Delta lpxR$ de *Helicobacter pylori* no presenta diferencias significativas de supervivencia frente a péptidos antimicrobianos con respecto a la cepa WT (Cullen *et al.*, 2011). Se propuso estudiar una cepa $\Delta lpxR$ de *S. Typhimurium* para confirmar o contrastar esas observaciones, teniendo como antecedentes que esta mutante sobrevive menos que la cepa WT en macrófagos (Kawano *et al.*, 2010). En concordancia con los resultados obtenidos en el trabajo realizado por Cullen (2011), la cepa $\Delta lpxR$ no mostró diferencias significativas en la supervivencia frente al péptido antimicrobiano polimixina B con respecto a la cepa WT.

7.2 Contribución de los genes *arnBCADTEF*, *eptA*, *waaL*, *lpxO*, *lpxR* y *pagP* en la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en una cepa de *D. discoideum* que carece del amebaporo ApID

Como se mencionó anteriormente, gran parte del ciclo de vida de *Salmonella* ocurre en el medioambiente, donde enfrenta condiciones adversas. En particular, su interacción con amebas resulta de vital importancia debido a que la bacteria ha desarrollado mecanismos para sobrevivir dentro de ella y así protegerse frente a condiciones ambientales desfavorables. Uno de los mecanismos que utiliza *Salmonella* para sobrevivir dentro de células fagocíticas es la modificación de su LPS. Dentro de estas modificaciones se encuentran aquellas necesarias para que la bacteria resista a la acción de los AMP del hospedero (Gunn *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2004; Moskowitz *et al.*, 2004; Tran *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007; Marr *et al.*, 2008). Por otra parte, un estudio realizado en nuestro laboratorio determinó que mutantes de *S. Typhimurium* en varios genes asociados a la biosíntesis y modificación del LPS presentaron defectos para sobrevivir intracelularmente en *D. discoideum* (Riquelme *et al.*, 2016).

Las amebas se alimentan de bacterias a través de procesos fagocíticos. Estos procesos de eliminación de bacterias son similares a los establecidos en macrófagos y estos mecanismos han perdurado durante la evolución (Steinert *et al.*, 2003; Cosson & Lima, 2014). Dentro de los mecanismos utilizados por los macrófagos para eliminar a *Salmonella* se encuentra la producción de péptidos antimicrobianos capaces de lisar la bacteria y para lo cual necesitan interactuar con su LPS. Los mecanismos que utiliza *Salmonella* para evitar la interacción con estos péptidos han sido ampliamente estudiados, en su mayoría en células de mamíferos. A pesar de eso, los mecanismos de esta bacteria para sobrevivir a las amebas ambientales no han sido muy estudiados. Es por esto, y gracias a una colaboración de nuestro grupo con el Dr. Thierry Soldati (University of Geneva) que nos aportó con la cepa de *D. discoideum* que carece del péptido AplD⁻, se estudió la supervivencia de las cepas mutantes de *Salmonella* y se buscó dilucidar si el amebaporo AplD está relacionado con los mecanismos de defensa utilizados por la ameba para eliminar a la bacteria.

Como se muestra en la **Figura 7A**, la cepa Δ *arnBCADTEF* compitió menos eficientemente que la cepa WT en un ensayo de supervivencia intracelular en *D. discoideum* durante la primera hora de infección. Esto sugiere que la adición del motivo L-Ara4N al grupo fosforilo del lípido A contribuye a la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en esta ameba. Por lo tanto, este resultado sugiere que esta modificación covalente del lípido A ayuda a la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium*, probablemente contribuyendo a la resistencia a la acción de los amebaporos que produce la ameba para defenderse y eliminar a la bacteria (Andrä *et al.*, 2003). En concordancia con lo hipotetizado, la supervivencia intracelular de la cepa Δ *arnBCADTEF* fue igual al de la cepa WT cuando la ameba infectada carecía del péptido antimicrobiano AplD (**Figura 9A**). En este caso, la cepa Δ *arnBCADTEF* y la cepa WT no presentaron diferencias significativas en cuanto a la supervivencia intracelular durante la primera hora de infección. Esto sugiere que la adición de L-Ara4N al lípido A no es relevante supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* cuando la ameba infectada carece del amebaporo. En tiempos más tardíos de infección, tanto la cepa mutante como la cepa WT se comportan de

manera similar en ambas cepas de *Dictyostelium*, lo que sugiere que la acción “protectora” de la adición de L-4Ara4N al lípido A ocurre solamente a tiempos cortos de infección.

Esta observación, concuerda con los resultados obtenidos en otras bacterias Gram negativo, donde la ameba carente del amebaporo AplD es incapaz de eliminar a la bacteria *K. pneumoniae* (Dhakshinamoorthy *et al.*, 2018). En conjunto, estos resultados indican que el amebaporo AplD forma parte del arsenal de factores que utiliza *D. discoideum* para eliminar bacterias Gram negativo.

Por su parte, las mutantes $\Delta eptA$ y $\Delta lpxR$ presentaron una menor supervivencia intracelular que la cepa WT dentro de *D. discoideum* AX2 a las 6 h post infección (**Figura 7C**). Como se describió, la cepa $\Delta eptA$ carece del gen que codifica la enzima que agrega el motivo fosfoetanolamina, modificación que disminuye la carga negativa de los grupos fosfatos del lípido A, al igual que la L-Ara4N. Este resultado sugiere que la adición del grupo aminoarabinosa sería suficiente para que la bacteria no sea detectada por los amebaporos a tiempos cortos de infección, pero a medida que aumenta el tiempo de infección se requerirían modificaciones adicionales del lípido A. En ese mismo tiempo (6 h post infección), pero en la ameba *D. discoideum* AplD⁻, se observó que este fenotipo se pierde (**Figura 9C**), ya que la cepa $\Delta eptA$ no presenta diferencias significativas en cuanto a la supervivencia intracelular con respecto a la cepa WT. Esto sugiere que el amebaporo AplD es parte del mecanismo por el cual la ameba logra eliminar a la bacteria y que la modificación realizada por la enzima que codifica el gen *eptA* permite a la bacteria sobrevivir intracelularmente. Este mecanismo sería importante solamente a tiempos mayores a las 6 h, ya que, a 1 y 3 h post infección la cepa $\Delta eptA$ se comporta de la misma forma que la cepa WT tanto en *D. discoideum* AX2 como en *D. discoideum* AX2 AplD⁻.

Por otro lado, se caracterizó en estudios previos la cepa $\Delta lpxR$, tanto en *S. Typhimurium* como en *H. pylori*, como una mutante que no es más susceptible a péptidos antimicrobianos que las cepas WT de cada una (Cullen *et al.*, 2011). A pesar de esto, sí se ha visto que estas cepas mutantes, en ambas bacterias,

sobreviven menos que la cepa WT en macrófagos de mamífero. Esto estaría mediado por otros mecanismos de reconocimiento característico de los macrófagos, como aquel mediado por los receptores TLR4 (Kawano *et al.*, 2010). Esto se condice con los resultados obtenidos al infectar la ameba *D. discoideum* AX2 y *D. discoideum* AX2 AplD⁻ con la cepa $\Delta lpxR$, ya que al tiempo 6 h post infección se observa una disminución en la supervivencia intracelular en ambos hospederos (**Figura 9F**). Esto sugeriría que el amebaporo no estaría involucrado en la eliminación de la bacteria. Un fenómeno similar ocurre en la cepa *D. discoideum* AX2 AplD⁻ a las 3 horas post infección, pero no en la cepa que posee el amebaporo. Más que una explicación biológica, se propone aumentar el número de repeticiones del experimento para disminuir la dispersión de los datos, esto podría ayudar a concluir de mejor forma qué es lo que sucede con la supervivencia intracelular cuando *S. Typhimurium* no expresa *lpxR*.

Dentro de las cepas mutantes también se trabajó con aquella que tenía delecionado el gen *pagP*, que codifica una enzima que adiciona cadenas aciladas al lípido A, generando una estructura heptaacilada. Este tipo de estructura permite mayor interacción entre las cadenas aciladas, disminuyendo la permeabilidad de la membrana externa y dificultando la entrada de moléculas foraneas al espacio periplasmático (Guo *et al.*, 1998). Según lo descrito en el trabajo de Guo, se esperaría que esta mutante sobreviviera menos intracelularmente que la cepa WT en *D. discoideum* AX2, ya que al tener una mayor permeabilidad de membrana externa permitiría un mayor paso de sustancias dañinas hacia el espacio periplasmático, incluyendo los CAMPs (Nobre *et al.*, 2015). Sin embargo, según los resultados obtenidos esta mutante no presenta defectos en su supervivencia intracelular con respecto a la cepa WT en ninguna de las dos cepas de *D. discoideum* analizadas y en ninguno de los tiempos de infección, por lo que se puede concluir que este gen no estaría relacionado con la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium*, ni a la acción del amebaporo AplD.

Otra mutante que tiene relación con la permeabilidad del lípido A es $\Delta lpxO$, gen que codifica una enzima que cataliza la hidroxilación de una de las cadenas aciladas del

lípidos A. Esta modificación permitiría una mayor interacción entre las cadenas aciladas, lo que disminuiría la permeabilidad de la membrana externa al igual que lo descrito en el caso de la enzima codificada por *pagP*. Según lo descrito en la literatura, se esperaría que una cepa $\Delta lpxO$ presentara una envoltura más permeable y, por ende, más susceptible a la acción de los amebaporos de la ameba. Sin embargo, nuestros datos no muestran una disminución significativa en la supervivencia intracelular de la cepa $\Delta lpxO$ respecto a la cepa WT cuando se infectó la cepa AX2 de *D. discoideum*. Por el contrario, la cepa $\Delta lpxO$ presentó una supervivencia intracelular significativamente menor que la cepa WT, luego de 3 h de infección de la ameba que carece de AplD. Este resultado por sí solo no nos demuestra si la hidroxilación del lípido A por la enzima LpxO está relacionada a la resistencia al amebaporo AplD, ya que, se ve como un fenotipo aislado con respecto a los otros tiempos de infección. Para tener certeza del resultado, se debería realizar un mayor número de réplicas de las infecciones, para así disminuir la dispersión de los datos. Por otra parte, en un estudio realizado por nuestro laboratorio en el que se evaluaba la supervivencia de esta mutante en macrófagos murinos, se observó que a tiempos largos de infección (24 h) existen diferencias significativas en la supervivencia intracelular de la cepa $\Delta lpxO$ y la cepa WT, sobreviviendo menos la cepa mutante (Amaya, 2018). Esto sugiere que la adición del grupo hidroxilo al lípido A es necesaria a tiempos mayores que los evaluados en esta tesis.

Por último la cepa $\Delta waaL$, la cual no posee el gen que codifica la ligasa del antígeno O por lo que generan un LPS incompleto, presenta comportamientos no esperados tanto en la cepa AX2 como en la cepa AX2 AplD⁻. En estudios realizados por nuestro grupo se observó que las cepas de *S. Typhimurium* que carecen de antígeno O sobreviven menos que la cepa WT tanto en *D. discoideum* AX4 (Riquelme *et al.*, 2016) como en macrófagos murinos a las 6 h post infección. Estos resultados no se conciben con los obtenidos en esta tesis, donde se observó que la cepa $\Delta waaL$ y la cepa WT presentan los mismos niveles de supervivencia en *D. discoideum* AX2 en todos los tiempos estudiados. Además, tanto a 1 h como a 6 h post infección se observó que la cepa $\Delta waaL$ sobrevive menos que la cepa WT dentro de la ameba que carece del amebaporo AplD. Estos resultados son distintos a los esperados y a

los descritos por el trabajo de Riquelme (2016), por lo que es posible se tenga que realizar más réplicas biológicas para obtener resultados más reproducibles.

Finalmente, en esta tesis se realizaron diferentes ensayos con el fin de establecer una relación entre la funcionalidad de genes que modifican proteínas involucradas en la modificación estructural del LPS de *S. Typhimurium* y la resistencia frente a la acción de péptidos antimicrobianos. Además, por primera vez se relacionaron estos genes con el amebaporo ApID de *D. discoideum*, lo que nos permitió comprender nuevos aspectos de la relación de *S. Typhimurium* con las amebas y cómo estos organismos son utilizados por la bacteria como reservorio en el medio ambiente.

8.- CONCLUSIONES

- El gen *waaL* y el operón *arnBCADTEF* son necesarios para la supervivencia de *S. Typhimurium* frente al péptido antimicrobiano polimixina B. Esto sugiere que un AgO completo y la adición de L-Ara4N a los grupos fosfatos del lípido A de la bacteria participan en este proceso.
- Los genes *arnBCADTEF*, *eptA* y *lpxR* son requeridos para la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*. Sin embargo, los genes *arnBCADTEF* y *eptA* no son requeridos para la supervivencia intracelular de la bacteria cuando *D. discoideum* carece del amebaporo ApID.
- En conjunto, nuestros resultados sugieren que la adición de L-Ara4N y pEtN a grupos fosforilos del lípido A de *S. Typhimurium* son necesarias para sobrevivir al efecto antibacteriano del amebaporo ApID durante la infección de *D. discoideum*.

9.- BIBLIOGRAFÍA

Abeyrathne, P. D., Daniels, C., Poon, K. K., Matewish, M. J., & Lam, J. S. (2005). Functional characterization of WaaL, a ligase associated with linking O-antigen polysaccharide to the core of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *Journal of Bacteriology*, **187**(9):3002-3012.

Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, **124**(4):783-801.

Alpuche Aranda, C. M., Swanson, J. A., Loomis, W.P & Miller, S. I. (1992). *Salmonella* Typhimurium activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**:10079-10083.

Amaya, F. (2018). Efecto de la hidroxilación del lípido A en *Salmonella enterica* serovar Enteritidis sobre la interacción con macrófagos murinos y la virulencia *in vivo*. Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Andersson, M., Gunne, H., Agerberth, B., Boman, A., Bergman, T., Sillard, R., Jörnvall, H., Mutt, V., Olsson, B., & Wigzell, H. (1995). NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumour activity. *The EMBO Journal*, **14**(8):1615-1625.

Andrä, J., Herbst, R., & Leippe, M. (2003). Amoebapores, archaic effector peptides of protozoan origin, are discharged into phagosomes and kill bacteria by permeabilizing their membranes. *Developmental and Comparative Immunology*, **27**(4):291-304.

Bader, M. W., Sanowar, S., Daley, M. E., Schneider, A. R., Cho, U., Xu, W., Klevit, R. E., Le Moual, H., & Miller, S. I. (2005). Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell*, **122**(3):461-472.

- Barlow, M., & Hall, B. G.** (2002). Origin and evolution of the AmpC β -lactamases of *Citrobacter freundii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46**(5):1190-1198.
- Bartholomew, T. L., Kidd, T. J., Sá Pessoa, J., Conde Álvarez, R., & Bengoechea, J. A.** (2019). 2-Hydroxylation of *Acinetobacter baumannii* lipid A contributes to virulence. *Infection and Immunity*, **87**(4):e00066-19.
- Beutler, B., & Cerami, A.** (1988). Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Annual Review of Biochemistry*, **57**:505-518.
- Bozzaro, S., & Eichinger, L.** (2011). The professional phagocyte *Dictyostelium discoideum* as a model host for bacterial pathogens. *Current Drug Targets*, **12**(7):942-954.
- Bruhn, H.** (2005). A short guided tour through functional and structural features of saposin-like proteins. *The Biochemical Journal*, **389**(Pt 2):249-257.
- Caroff, M., & Karibian, D.** (2003). Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydrate Research*, **338**(23):2431-2447.
- 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.
- Cosson, P., & Lima, W. C.** (2014). Intracellular killing of bacteria: is *Dictyostelium* a model macrophage or an alien? *Cellular Microbiology*, **16**(6):816-823.
- Cullen, T. W., Giles, D. K., Wolf, L. N., Ecobichon, C., & Boneca, I. G.** (2011). *Helicobacter pylori* versus the Host: Remodeling of the Bacterial Outer Membrane Is Required for Survival in the Gastric Mucosa. *PLoS Pathogens*, **7**(12):e1002454.
- 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 of the United States of America*, **97**(12):6640-6645.
- Dhakshinamoorthy, R., Bitzhenner, M., Cosson, P., Soldati, T., & Leippe, M.** (2018). The Saposin-Like Protein ApID Displays Pore-Forming Activity and

Participates in Defense Against Bacterial Infection During a Multicellular Stage of *Dictyostelium discoideum*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **8**:73.

Dunn, J. D., Bosmani, C., Barisch, C., Raykov, L., Lefrançois, L. H., Cardenal-Muñoz, E., López-Jiménez, A. T., & Soldati, T. (2018). Eat Prey, Live: *Dictyostelium discoideum* As a Model for Cell-Autonomous Defenses. *Frontiers in Immunology*, **8**:1906.

Eichinger, L. (2003). Revamp a model-status and prospects of the *Dictyostelium* genome project. *Current Genetics*, **44**(2):59-72.

Elfenbein, J. R., Endicott-Yazdani, T., Porwollik, S., Bogomolnaya, L. M., Cheng, P., Guo, J., Zheng, Y., Yang, H. J., Talamantes, M., Shields, C., Maple, A., Ragoza, Y., DeAtley, K., Tatsch, T., Cui, P., Andrews, K. D., McClelland, M., Lawhon, S. D., & Andrews-Polymenis, H. (2013). Novel determinants of intestinal colonization of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium identified in bovine enteric infection. *Infection and Immunity*, **81**(11):4311-4320.

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 rhyodes*. *Genomics*, **94**(2):132-137.

Fernández, P. A., Velásquez, F., Garcias-Papayani, H., Amaya, F. A., Ortega, J., Gómez, S., Santiviago, C. A., & Álvarez, S. A. (2018). Fnr and ArcA Regulate Lipid A Hydroxylation in *Salmonella* Enteritidis by Controlling *lpxO* Expression in Response to Oxygen Availability. *Frontiers in Microbiology*, **9**:1220.

Fields, P. I., Groisman, E. A., & Heffron, F. (1989). A *Salmonella* locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. *Science*, **243**(4894 Pt 1):1059-1062.

Garcia del Portillo, F., Foster, J. W., & Finlay, B. B. (1993). Role of acid tolerance response genes in *Salmonella* Typhimurium virulence. *Infection and Immunity*, **61**(10):4489-4492.

- 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.
- Goto, R., Miki, T., Nakamura, N., Fujimoto, M., & Okada, N.** (2017). *Salmonella* Typhimurium PagP- and UgtL-dependent resistance to antimicrobial peptides contributes to the gut colonization. *PLoS One*, **12**(12):e0190095.
- Gunn, J. S., & Miller, S. I.** (1996). PhoP-PhoQ activates transcription of *pmrAB*, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella* Typhimurium antimicrobial peptide resistance. *Journal of Bacteriology*, **178**(23):6857-6864.
- Gunn, J. S., Lim, K. B., Krueger, J., Kim, K., Guo, L., Hackett, M., & Miller, S. I.** (1998). PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Molecular Microbiology*, **27**(6):1171-1182.
- Gunn, J. S., Ryan, S. S., Van Velkinburgh, J. C., Ernst, R. K. & Miller, S. I.** (2000). Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and Immunity*, **68**:6139-6146.
- Gunn, J. S.** (2008). The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends in Microbiology*, **16**(6):284-290.
- Guo, L., Lim, K. B., Poduje, C. M., Daniel, M., Gunn, J. S., Hackett, M., & Miller, S. I.** (1998). Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell*, **95**(2):189-198.
- Haraga, A., Ohlson, M. B., & Miller S. I.** (2008). Salmonellae interplay with host cells. *Nature Reviews Microbiology*, **6**:53-66.
- Harf, C.** (1994). Free-living amoeba: interactions with environmental pathogenic bacteria. *Endocytobiosis and Cell Research*, **10**:167-183.

Hancock, R. E. (2001). Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet Infectious Diseases*, **1**(3):156-164.

Hölzer, S. U., Schlumberger, M. C., Jäckel, D., & Hensel, M. (2009). Effect of the O-antigen length of lipopolysaccharide on the functions of Type III secretion systems in *Salmonella enterica*. *Infection and Immunity*, **77**(12):5458-5470.

Kawano, M., Manabe, T., & Kawasaki, K. (2010). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lipopolysaccharide deacylation enhances its intracellular growth within macrophages. *FEBS Letters*, **584**(1):207-212.

Kawasaki, K., Ernst, R. K., & Miller, S. I. (2005). Inhibition of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lipopolysaccharide deacylation by aminoarabinose membrane modification. *Journal of Bacteriology*, **187**(7):2448-2457.

Kim, S. H., Jia, W., Parreira, V. R., Bishop, R. E., & Gyles, C. L. (2006). Phosphoethanolamine substitution in the lipid A of *Escherichia coli* O157:H7 and its association with PmrC. *Microbiology*, **152**(Pt 3):657-666.

King, C. H., Shotts, E. B., Jr, Wooley, R. E., & Porter, K. G. (1988). Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**(12):3023-3033.

Lee, H., Hsu, F. F., Turk, J., & Groisman, E. A. (2004). The PmrA-regulated *pmrC* gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology*, **186**(13):4124-4133.

Leippe, M. (1999). Antimicrobial and cytolytic polypeptides of amoeboid protozoa - effector molecules of primitive phagocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, **23**(4-5):267-279.

Leippe, M. (2014). Pore-forming toxins from pathogenic amoebae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **98**(10):4347-4353.

Liepinsh, E., Andersson, M., Ruyschaert, J. M., & Otting, G. (1997). Saposin fold revealed by the NMR structure of NK-lysin. *Nature Structural Biology*, **4**(10):793-795.

Llobet, E., Martínez-Moliner, V., Moranta, D., Dahlström, K. M., Regueiro, V., Tomás, A., Cano, V., Pérez-Gutierrez, C., Frank, C., Fernández Carrasco, H., Insua J., Salminen, T., Garmendia, J. & Bengoechea, J. A. (2015). Deciphering tissue-induced *Klebsiella pneumoniae* lipid A structure. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **112**(46):E6369-E6378.

Maeshima, N., & Fernandez, R. C. (2013). Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, **3**:3.

Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., Jones, T. F., Fazil, A., Hoekstra, R. M., & International Collaboration on Enteric Disease 'Burden of Illness' Studies (2010). The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. Infectious Diseases Society of America, **50**(6):882-889.

Maloy, S. R. (1990). Experimental techniques in bacterial genetics. Jones & Bartlett Learning.

Matamouros, S., & Miller, S. I. (2015). S. Typhimurium strategies to resist killing by cationic antimicrobial peptides. Biochimica et Biophysica Acta, **1848**(11 Pt B):3021-3025.

Miller, S. I., Kukral, A. M., & Mekalanos, J. J. (1989). A two-component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **86**(13):5054-5058.

Mlynarcik, P. & Kolar, M. (2019). Molecular mechanisms of polymyxin resistance and detection of *mcr* genes. Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky University, Olomouc, Czechoslovakia, **163**(1):28-38.

Mohapatra, S. S., Dwibedy, S. K., & Padhy, I. (2021). Polymyxins, the last-resort antibiotics: Mode of action, resistance emergence, and potential solutions. Journal of Biosciences, **46**(3):1-18.

Molinaro, A., Holst, O., Di Lorenzo, F., Callaghan, M., Nurisso, A., D'Errico, G., Zamyatina, A., Peri, F., Berisio, R., Jerala, R., Jiménez-Barbero, J., Silipo, A., &

- Martín-Santamaría, S.** (2015). Chemistry of lipid A: at the heart of innate immunity. *Chemistry*, **21**(2):500-519.
- Moskowitz, S. M., Ernst, R. K., & Miller, S. I.** (2004). PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *Journal of Bacteriology*, **186**(2):575-579.
- Munford, R. S., Sheppard, P. O., & O'Hara, P. J.** (1995). Saposin-like proteins (SAPLIP) carry out diverse functions on a common backbone structure. *Journal of Lipid Research*, **36**(8):1653-1663.
- Murata, T., Tseng, W., Guina, T., Miller, S. I., & Nikaido, H.** (2007). PhoPQ-mediated regulation produces a more robust permeability barrier in the outer membrane of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, **189**(20):7213-7222.
- Murray, S. R., Ernst, R. K., Bermudes, D., Miller, S. I., & Low, K. B.** (2007). PmrA(Con) confers *pmrHFIJKL*-dependent EGTA and polymyxin resistance on *msbB Salmonella* by decorating lipid A with phosphoethanolamine. *Journal of Bacteriology*, **189**(14):5161-5169.
- Needham, B. D. & Trent, M. S.** (2013). Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, **11**:467-481.
- Nikaido, H.** (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **67**(4):593-656.
- Nobre, T. M., Martynowycz, M. W., Andreev, K., Kuzmenko, I., Nikaido, H., & Gidalevitz, D.** (2015). Modification of *Salmonella* lipopolysaccharides prevents the outer membrane penetration of novobiocin. *Biophysical Journal*, **109**(12):2537-2545.
- Raetz, C. R., & Whitfield, C.** (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, **71**:635-700.

Raetz, C. R., Reynolds, C. M., Trent, M. S., & Bishop, R. E. (2007). Lipid A modification systems in Gram-negative bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, **76**:295-329.

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.

Reddington, J. J., Reddington, G. M., & MacLachlan, N. J. (1991). A competitive ELISA for detection of antibodies to the group antigen of bluetongue virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. The American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, **3**(2):144-147.

Reeves, M. W., Evins, G. M., Heiba, A. A., Plikaytis, B. D., & Farmer, J. J., 3rd (1989). Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *Journal of Clinical Microbiology*, **27**(2):313-320.

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.

Ricci, V., Zhang, D., Teale, C., & Piddock, L. J. (2020). The O-antigen epitope governs susceptibility to colistin in *Salmonella enterica*. *mBio*, **11**(1):e02831-19.

Rietschel, E. T., Kirikae, T., Schade, F. U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A. J., Zähringer, U., Seydel, U., & Di Padova, F. (1994). Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *The FASEB Journal*, **8**(2):217-225.

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.

Roncero, C., & Casadaban, M. J. (1992). Genetic analysis of the genes involved in synthesis of the lipopolysaccharide core in *Escherichia coli* K-12: three operons in the *rfa* locus. *Journal of Bacteriology*, **174**(10):3250-3260.

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.

Rutten, L., Mannie, J. P., Stead, C. M., Raetz, C. R., Reynolds, C. M., Bonvin, A. M., Tommassen, J. P., Egmond, M. R., Trent, M. S., & Gros, P. (2009). Active-site architecture and catalytic mechanism of the lipid A deacylase LpxR of *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**(6):1960-1964.

Sabag, A. (2017). Análisis comparativo de los genes involucrados en la supervivencia intracelular de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en macrófagos murinos y en la ameba *Dictyostelium discoideum*. Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Samuel, G., & Reeves, P. (2003). Biosynthesis of O-antigens: genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly. *Carbohydrate Research*, **338**(23):2503-2519.

Santiviago, C. A., Reynolds, M. M., Porwollik, S., Choi, S. H., Long, F., Andrews-Polymenis, H. L., & McClelland, M. (2009). Analysis of pools of targeted *Salmonella* deletion mutants identifies novel genes affecting fitness during competitive infection in mice. *PLoS Pathogens*, **5**(7):e1000477.

Schmieger, H. (1972). Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities. *Molecular and General Genetics*, **119**(1):75-88.

Schnaitman, C. A. & Klena, J. D. (1993). Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiological Reviews*, **57**:655-682.

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.

Simpson, B. W., & Trent, M. S. (2019). Pushing the envelope: LPS modifications and their consequences. *Nature Reviews Microbiology*, **17**(7):403-416.

Soncini, F. C., García Véscovi, E., Solomon, F. & Groisman, E. A. (1996). Molecular basis of the magnesium deprivation response in *Salmonella* Typhimurium: identification of PhoP-regulated genes. *Journal of Bacteriology*, **178**:5092-5099.

Steinert, M., Leippe, M., & Roeder, T. (2003). Surrogate hosts: protozoa and invertebrates as models for studying pathogen-host interactions. *International Journal of Medical Microbiology*, **293**(5):321-332.

Tamayo, R., Choudhury, B., Septer, A., Merighi, M., Carlson, R., & Gunn, J. S. (2005). Identification of *cptA*, a PmrA-regulated locus required for phosphoethanolamine modification of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lipopolysaccharide core. *Journal of Bacteriology*, **187**(10):3391-3399.

Tezcan-Merdol, D., Ljungström, M., Winiecka-Krusnell, J., Linder, E., Engstrand, L., & Rhen, M. (2004). Uptake and replication of *Salmonella enterica* in *Acanthamoeba rhyssodes*. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**(6):3706-3714.

Tran, A. X., Lester, M. E., Stead, C. M., Raetz, C. R., Maskell, D. J., McGrath, S. C., Cotter, R. J., & Trent, M. S. (2005). Resistance to the antimicrobial peptide polymyxin requires myristoylation of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* lipid A. *Journal of Biological Chemistry*, **280**(31):28186-28194.

Trent, M. S., Ribeiro, A. A., Lin, S., Cotter, R. J., & Raetz, C. R. (2001). An Inner Membrane Enzyme in *Salmonella* and *Escherichia coli* That Transfers 4-Amino-4-deoxy-L-arabinose to Lipid A: Induction in polymyxin resistant mutants and role of a novel lipid-linked donor. *Journal of Biological Chemistry*, **276**(46):43122-43131.

Valvano, M. A. (2015). Genetics and biosynthesis of lipopolysaccharide. *En Molecular Medical Microbiology* (pp. 55-89). Academic Press.

Wang, X., & Quinn, P. J. (2010). Endotoxins: lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria. *Sub-cellular Biochemistry*, **53**:3-25.

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.

Whitfield, C., Amor, P. A., & Köplin, R. (1997). Modulation of the surface architecture of Gram-negative bacteria by the action of surface polymer:lipid A-core ligase and by determinants of polymer chain length. *Molecular Microbiology*, **23**(4):629-638.

Woodward, R., Yi, W., Li, L., Zhao, G., Eguchi, H., Sridhar, P. R., Guo, H., Song, J. K., Motari, E., Cai, L., Kelleher, P., Liu, X., Han, W., Zhang, W., Ding, Y., Li, M., & Wang, P. G. (2010). *In vitro* bacterial polysaccharide biosynthesis: defining the functions of Wzy and Wzz. *Nature Chemical Biology*, **6**(6):418-423.

Wösten, M. M., Kox, L. F, Chamnongpol, S., Soncini, F. C. & Groisman, E. A. (2000). A signal transduction system that responds to extracellular iron. *Cell*, **103**:113-125.