

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**Contribución de los factores de virulencia SopB,
SptP y PphB de *Salmonella enterica* serovar
Typhimurium en la modulación del proceso de
autofagia en la ameba *Dictyostelium discoideum* y
en macrófagos murinos**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Doctor en Bioquímica por:**

Ítalo Marcial Urrutia Henríquez

Director de Tesis: Dr. Carlos A. Santiviago

Santiago - CHILE

Agosto 2019

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

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

Ítalo Marcial Urrutia Henríquez

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Bioquímica, en el examen público rendido el día

_____.

Director de Tesis:

Dr. Carlos A. Santiviago

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Alfonso Paredes

Dra. María Carmen Molina

Dr. Alfredo Criollo

Dr. Guido Mora

Haz las cosas lo más simple que puedas,
pero no te limites a lo simple.

-Albert Einstein-

Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer a mi familia. A mis padres Lilian y Ricardo y a mi hermano Ricardo, por su completo e incondicional apoyo desde el comienzo de éste nuevo desafío de mi vida que ya finaliza. Fueron, son y seguirán siendo el pilar más fuerte para poder continuar y terminar.

Quisiera agradecer a mi señora Allison por ser quien me espera, me apaña, me ayuda, me aconseja, me guía, por querer siempre lo mejor para mí. Gracias pollo. A Mica y a Quimi por hacer más alegre nuestras vidas.

Agradezco a mi tutor de tesis, Cliff, por su apoyo y preocupación en cada etapa de este proceso. Gracias por darme la confianza y la oportunidad de desarrollarme en el laboratorio y por aportar en mi crecimiento profesional. Además, agradezco a Sergio Álvarez por su apoyo y simpatía.

Quisiera agradecer al Dr. Ricardo Escalante quien me recibió en su laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de la Universidad Autónoma de Madrid. A Sandra, Eunice y LuisCa por hacer tan grata mi estadía en el laboratorio.

Agradezco a los miembros de mi comisión evaluadora, al Dr. Alfonso Paredes, Dra. María Carmen Molina, Dr. Alfredo Criollo y al Dr. Guido Mora por su guía y sus consejos para mejorar este trabajo.

Quisiera agradecer a mis compañeros de laboratorio, a Polina, Kamo y Andréa por su cariño, apoyo y por los buenos momentos que pasamos en el lab y en los viajes de congreso, fueron las mejores amigas; Fernando, por su gran amistad y siempre estar dispuesto a ayudar; Lon-Jimmy, Héctor, Morgan, Negro, Chinchi y Cometa por la buena onda, chancherías y buena música y a Bea por su ayuda y comprensión. Sabemos que este laboratorio tiene un ambiente grato por las personas que lo componen, muchas gracias por todo este tiempo que facilitó el trabajo.

Agradezco también a mis amigos que me han acompañado y apoyado. Gracias Pelao y Maca por su sincera amistad y fanatismo por los asados. Gracias Foncha y Paty por estar siempre presentes desde la distancia. A mis amigos del Moralab: Nico, Lucho y Matías gracias por seguir presentes. A Carlos Blondel por recibirme en su laboratorio en esta nueva etapa que inicia, gracias por permitirme seguir investigando; A Vero, Nicolás y Sebastián del BlondelLab por su apoyo y motivación.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Carlos A. Santiviago. Parte del trabajo experimental se desarrolló en el Laboratorio de Genómica Funcional en *Dictyostelium* del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de la Universidad Autónoma de Madrid, en el marco de una colaboración internacional con el Dr. Ricardo Escalante.

Para su desarrollo, esta tesis contó con financiamiento de los proyectos FONDECYT 1140754 y 1171844 del Dr. Carlos Santiviago y de la Beca de Doctorado Nacional CONICYT 21150005. Además, este trabajo contó con financiamiento del proyecto MINECO BFU2015-64440-P del Dr. Ricardo Escalante.

1. PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS

1.1. Publicaciones

Ítalo M. Urrutia, Andrea Sabag, Camila Valenzuela, Bayron Labra, Sergio A. Álvarez, Carlos A. Santiviago (2018). “Contribution of the twin-arginine translocation system to the intracellular survival of *Salmonella* Typhimurium in *Dictyostelium discoideum*”. *Front. Microbiol.* **9**:3001. doi: 10.3389/fmicb.2018.03001.

1.2. Presentaciones en congresos

Ítalo M. Urrutia, Andrea Sabag, Camila Valenzuela, Sergio A. Álvarez, Carlos A. Santiviago. “Contribución del sistema de secreción Tat en la supervivencia intracelular de *Salmonella* Typhimurium en la ameba *Dictyostelium discoideum*”. XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología, 13 al 16 de Noviembre, 2018. Santiago, Chile.

Carlos A. Santiviago, Sebastián Riquelme, Macarena Varas, Andrea Sabag, Bayron Labra, Nicolás Chahin, Paula Velozo, Camila Valenzuela, **Ítalo M. Urrutia**, Beatriz Salas, Jaime Ortega, Constanza Morgado, Gabriel Vera, Fernando Baisón-Olmo, Sergio A. Álvarez y Francisco P. Chávez. “Molecular mechanisms involved in the intracellular survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*”. XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología, 13 al 16 de Noviembre, 2018. Santiago, Chile.

Camila Valenzuela, Magdalena Gil, Andrea Sabag, **Ítalo M. Urrutia**, Jost Enninga, Carlos A. Santiviago. “Análisis proteómico de la vacuola contenedora de *Salmonella* en la ameba social *Dictyostelium discoideum*”. XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología, 13 al 16 de Noviembre, 2018. Santiago, Chile.

Ítalo M. Urrutia, Beatriz Salas, Andrea Sabag, Camila Valenzuela, Sergio A. Álvarez, Ricardo Escalante, Carlos A. Santiviago. “Los factores de virulencia SopB, SptP y PphB de *Salmonella* Typhimurium contribuyen en la subversión de la autofagia en la ameba *Dictyostelium discoideum* y en macrófagos murinos RAW264.7”. XXXIX Congreso Chileno de Microbiología, 14 al 17 de Noviembre, 2017. La Serena, Chile.

Camila Valenzuela, Andrea Sabag, **Ítalo M. Urrutia**, Magdalena Gil, Macarena Varas, Jost Enninga, Carlos A. Santiviago. “*Salmonella* Typhimurium requires SopB and SifA to survive intracellularly in a SCV-like compartment in *Dictyostelium discoideum*”. International *Dictyostelium discoideum* Conference 2017. 20 al 24 de Agosto, 2017. Ginebra, Suiza.

Ítalo M. Urrutia, Beatriz Salas, Camila Valenzuela, Sergio A. Álvarez, Ricardo Escalante, Carlos A. Santiviago. “*Salmonella* Typhimurium virulence factors SopB, SptP and PphB contribute to evasion of autophagy in the amoeba *Dictyostelium discoideum* and RAW264.7 macrophages”. 7th Congress of European Microbiologists (FEMS 2017), 9 al 13 de Julio, 2017. Valencia, España.

Bayron Labra, Andrea Sabag, Camila Valenzuela, **Ítalo M. Urrutia**, Sebastián Riquelme, Steffen Porwollik, Michael McClelland, Sergio A. Álvarez, Carlos A. Santiviago. “Genome-wide identification of genes required for the intracellular survival of *S. Typhimurium* in the amoeba *D. discoideum*”. 7th Congress of European Microbiologists (FEMS 2017), 9 al 13 de Julio, 2017. Valencia, España.

Ítalo M. Urrutia, Beatriz Salas, Camila Valenzuela, Andrea Sabag, Bayron Labra, Sergio A. Álvarez, Carlos A. Santiviago. “Contribución de SopB, SptP y PphB en la supervivencia intracelular de *Salmonella Typhimurium* en *Dictyostelium discoideum* y macrófagos RAW264.7”. XXXVIII Congreso Chileno de Microbiología, 22 al 25 de Noviembre, 2016. Valdivia, Chile.

Beatriz Salas, **Ítalo M. Urrutia**, Sergio A. Álvarez, Carlos A. Santiviago. Expresión de PphB en *Salmonella Typhimurium* y su contribución en la supervivencia intracelular en la ameba *Dictyostelium discoideum*. XXXVIII Congreso Chileno de Microbiología, 22 al 25 de Noviembre, 2016. Valdivia, Chile.

Camila Valenzuela, Andrea Sabag, Macarena Varas, **Ítalo M. Urrutia**, Constanza Morgado, Bayron Labra, Francisco P. Chávez, Carlos A. Santiviago. “*Salmonella Typhimurium* requiere a los efectores SopB y SifA para sobrevivir intracelularmente en un compartimento vacuolar en *Dictyostelium discoideum*”. XXXVIII Congreso Chileno de Microbiología, 22 al 25 de Noviembre, 2016. Valdivia, Chile.

Ítalo M. Urrutia, Bayron Labra, Andrea Sabag, Camila Valenzuela, Sergio A. Álvarez, Carlos A. Santiviago. “Contribución del sistema de secreción Twin-arginine translocation (Tat) en la supervivencia intracelular de *Salmonella* Typhimurium en la ameba *Dictyostelium discoideum*”. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología, 26 al 30 de Septiembre, 2016. Rosario, Santa Fe, Argentina.

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

Ítalo M. Urrutia, Carlos A. Santiviago. “Contribution of SopB, SptP y PphB in the intracellular survival of *Salmonella* Typhimurium in *Dictyostelium discoideum* and RAW264.7 macrophages”. ASM Microbe 2016, 16 al 20 de Junio, 2016. Boston, Massachusetts, USA.

Ítalo M. Urrutia, Bayron Labra, Paula Velozo, Carlos A. Santiviago. Contribución de SopB, SptP y PphB en la supervivencia intracelular de *Salmonella* Typhimurium en la ameba *Dictyostelium discoideum*. XXXVII Congreso Chileno de Microbiología, 1 al 4 de Diciembre, 2015. La Serena, Chile.

2. TABLA DE CONTENIDOS

1. PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS	VI
1.1. Publicaciones	VI
1.2. Presentaciones en congresos	VI
2. TABLA DE CONTENIDOS	X
3. LISTA DE TABLAS	XIII
4. LISTA DE FIGURAS	XIV
5. LISTA DE ABREVIATURAS	XV
6. RESUMEN.....	XVII
7. SUMMARY	XX
8. INTRODUCCIÓN	1
8.1. Género <i>Salmonella</i>	1
8.2. Factores de virulencia de <i>Salmonella</i>	4
8.3. Interacción <i>Salmonella</i> -amebas	6
8.4. Autofagia	11
8.5. Autofagia en <i>Dictyostelium discoideum</i>	17
8.6. Autofagia como mecanismo de defensa contra patógenos	19
8.7. Efectores de <i>Salmonella</i> que modularían la autofagia en la célula hospedera.....	21
8.8. Propuesta de investigación.....	24
9. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	25
9.1 Hipótesis	25
9.2 Objetivo general.....	25
9.3 Objetivos específicos	26
10. MATERIALES Y MÉTODOS	27
10.1 Reactivos.....	27
10.2 Cepas bacterianas.....	30
10.3 Líneas celulares.....	31
10.4 Plasmidios.....	31
10.5 Partidores	32
10.6 Medios y condiciones de cultivo bacterianos	32
10.7 Medios y condiciones de cultivo celular.....	33

10.7.1 <i>Dictyostelium discoideum</i> AX4	33
10.7.2 <i>Dictyostelium discoideum</i> AX4 GFP-LC3	34
10.7.3 Macrófagos RAW264.7	34
10.7.4 Macrófagos RAW264.7 EGFP-LC3	35
10.8 Extracción de DNA genómico	36
10.9 Extracción de DNA plasmidial	36
10.10 Construcción de cepas mutantes de <i>S. Typhimurium</i> con delección de genes específicos mediante el método Red-swap	37
10.10.1 Obtención de productos de PCR para la generación de las cepas mutantes	37
10.10.2 Preparación de bacterias electrocompetentes y transformación bacteriana	38
10.10.3 Mutagénesis por recombinación de productos de PCR	39
10.10.4 Comprobación de las colonias mutantes mediante PCR	40
10.11 Complementación en <i>trans</i> de las mutantes $\Delta sopB$, $\Delta sptP$ y $\Delta pphB$ de <i>S. Typhimurium</i>	41
10.12 Ensayos de infección en líneas celulares	43
10.12.1 Ensayos de infección en macrófagos murinos RAW264.7	43
10.12.2 Ensayos de infección en <i>Dictyostelium discoideum</i>	44
10.13 Ensayos de infección para microscopía confocal	45
10.13.1 Ensayos de infección en macrófagos RAW264.7 EGFP-LC3	45
10.13.2 Ensayos de infección en <i>Dictyostelium discoideum</i> GFP-LC3	46
10.14 Ensayos de electrotransferencia de proteínas a PVDF e inmunodetección (<i>western blot</i>)	48
10.14.1 Preparación de extractos proteicos de macrófagos RAW264.7	48
10.14.2 Preparación de extractos proteicos de <i>D. discoideum</i>	48
10.14.3 Cuantificación de proteínas	49
10.14.4 Análisis mediante SDS-PAGE, electrotransferencia e inmunodetección	49
10.15 Ensayos de toxicidad bacteriana	50
10.16 Análisis estadístico y expresión de resultados	51
11. RESULTADOS	53
11.1 Participación de los factores de virulencia SopB, SptP y PphB en la supervivencia intracelular de <i>S. Typhimurium</i> en <i>D. discoideum</i>	53
11.2 Participación de los factores de virulencia SopB, SptP y PphB en la supervivencia intracelular de <i>S. Typhimurium</i> en macrófagos murinos	62
11.3 Participación de los factores de virulencia SopB, SptP y PphB de <i>S. Typhimurium</i> en la modulación del proceso autofágico en <i>D. discoideum</i>	64

11.4 Participación de los factores de virulencia SopB, SptP y PphB de <i>S. Typhimurium</i> en la modulación del proceso autofágico en macrófagos murinos	69
11.4.1 Participación de los factores de virulencia SopB, SptP y PphB de <i>S. Typhimurium</i> en la modulación de AKT, ERK y mTORC1 durante la infección de <i>D. discoideum</i>	74
11.4.2 Participación de los factores de virulencia SopB, SptP y PphB de <i>S. Typhimurium</i> en la modulación de AKT, ERK y mTORC1 durante la infección de macrófagos murinos.....	75
12. DISCUSIÓN	79
12.1 Desarrollo de un nuevo ensayo de infección para cepas de <i>S. Typhimurium</i> en <i>D. discoideum</i>	79
12.2 Contribución de las proteínas efectoras SopB, SptP y PphB en la supervivencia intracelular de <i>S. Typhimurium</i>	81
12.3 Rol de las proteínas efectoras SopB, SptP y PphB de <i>S. Typhimurium</i> en el control de la autofagia.....	85
12.4 Modulación de la autofagia mediada por las proteínas efectoras SopB y SptP de <i>S. Typhimurium</i> durante la infección de macrófagos murinos	94
13. CONCLUSIONES.....	96
14. REFERENCIAS	98

3. LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas usadas en esta tesis	30
Tabla 2. Líneas celulares usadas en esta tesis	31
Tabla 3. Plasmidios usados en esta tesis	31
Tabla 4. Partidores usados en esta tesis	32

4. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proceso infectivo de <i>Salmonella</i>	3
Figura 2. Cambios que inducen las proteínas efectoras del SST3 ^{SPI-1} y SST3 ^{SPI-2} de <i>Salmonella</i> en la célula hospedera	6
Figura 3. Maquinaria molecular del proceso de autofagia.....	14
Figura 4. Vías de señalización intracelular que regulan autofagia	16
Figura 5. Generación y comprobación de mutantes de <i>S. Typhimurium</i>	54
Figura 6. Esquema del ensayo de infección de <i>S. Typhimurium</i> en <i>D. discoideum</i>	56
Figura 7. Evaluación cualitativa de la citotoxicidad causada por cepas de <i>S. Typhimurium</i> en <i>D. discoideum</i>	58
Figura 8. Internalización relativa de cepas de <i>S. Typhimurium</i> en <i>D. discoideum</i>	59
Figura 9. Supervivencia intracelular de cepas de <i>S. Typhimurium</i> en <i>D. discoideum</i> ...	61
Figura 10. Internalización relativa de cepas de <i>S. Typhimurium</i> en macrófagos murinos RAW264.7	62
Figura 11. Supervivencia intracelular de cepas de <i>S. Typhimurium</i> en macrófagos murinos RAW264.7	63
Figura 12. Cuantificación de autofagosomas durante la infección de <i>D. discoideum</i> con cepas de <i>S. Typhimurium</i>	66
Figura 13. Flujo autofágico durante la infección de <i>D. discoideum</i> con cepas de <i>S. Typhimurium</i>	68
Figura 14. Cuantificación de autofagosomas durante la infección de macrófagos RAW264.7 con cepas de <i>S. Typhimurium</i>	71
Figura 15. Flujo autofágico durante la infección de macrófagos RAW264.7 con cepas de <i>S. Typhimurium</i>	73
Figura 16. Efecto sobre AKT, ERK y mTORC1 al infectar macrófagos RAW264.7 con distintas cepas de <i>S. Typhimurium</i>	77
Figura 17. Modulación de la autofagia en macrófagos RAW264.7 mediada por los efectores SopB y SptP de <i>S. Typhimurium</i>	95

5. LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
AKT	<i>Protein Kinase B (PKB)</i>
Ambra	<i>Activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy protein 1</i>
Amp	Ampicilina
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
APS	Persulfato de amonio
Cam	Cloranfenicol
CQ	Cloroquina
°C	Grados Celcius
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitosina trifosfato
DEPTOR	<i>DEP domain-containing mTOR-interacting protein</i>
dGTP	Desoxiguanocina trifosfato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFP-LC3	Proteína fluorescente verde eucarionte fusionada a la proteína LC3
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
x g	Aceleración gravitacional
g	Gramos
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
Gen	Gentamicina
GFP	Proteína fluorescente verde
GFP-LC3	Proteína fluorescente verde fusionada a la proteína LC3
g/L	Gramos por litro
h	Horas
HRP	Peroxidasa de rábano
IP	inhibidores de proteasas
Kan	Kanamicina
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
L	Litros
LB	Luria Bertani
LC3	<i>Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A</i>
M	Molar
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MEK	<i>MAPK/ERK kinase</i>
mg	Miligramos
min	Minutos

mL	Mililitros
mM	Milimolar
MOI	Multiplicidad de infección
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NDP52	<i>Nuclear dot protein</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
nm	Nanómetros
nM	Nanomolar
OD _{600nm}	Densidad óptica medida a 600 nm
OPTN	Optineurina
ORF	Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PBS	<i>Buffer</i> fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Fosfatidil etanolamina
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3 kinase</i>
PI(3,4)P ₂	Fosfatidil inositol 3,4 bifosfato
PI(4,5)P ₂	Fosfatidil inositol 4,5 bifosfato
PI(3,4,5)P ₃	Fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato
Proctor-1	<i>Protein observed with Rictor</i>
Raptor	<i>Regulatory-associated protein 1</i>
RHEB	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
Rictor	<i>Rapamycin-insensitive companion of TOR</i>
SFB	Suero fetal bovino
s	Segundos
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles desnaturantes de poliacrilamida
SNT	Serovares no tifoideos
SPI	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i>
SST3	Sistema de secreción de tipo III
Str	Estreptomicina
TAE	Tris-acetato-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamina
T-PER	<i>Tissue protein extraction reagent</i>
UFC	Unidades formadoras de colonias
ULK	<i>Unc-51 like autophagy activating kinase</i>
V	Volts
VCL	Vacuola contenedora de <i>Legionella</i>
VCS	Vacuola contenedora de <i>Salmonella</i>
Vps	<i>Vacuolar protein sorting</i>
WT	<i>Wild-type</i> (cepa silvestre)
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μm	Micrometros
μM	Micromolar

6. RESUMEN

Salmonella es una bacteria patógena capaz de generar cuadros clínicos que abarcan desde una gastroenteritis autolimitada hasta infecciones sistémicas que pueden causar la muerte del hospedero. El proceso infeccioso de *Salmonella* comienza con la ingesta de alimentos o aguas contaminados con la bacteria, para posteriormente enfrentarse a las células epiteliales intestinales, primera barrera física del hospedero. Posteriormente interactúa con células fagocíticas profesionales del sistema inmune innato, causando una respuesta inflamatoria local que finalmente genera la eliminación de la bacteria al medio ambiente. *Salmonella* tiene la capacidad de sobrevivir intracelularmente en células fagocíticas como macrófagos, los que se transforman en verdaderos vectores de diseminación sistémica. Si bien se han estudiado en profundidad los mecanismos moleculares de esta bacteria para sobrevivir dentro de los macrófagos, existe escasa información referente a los mecanismos de supervivencia que emplea en otros estadios de su ciclo de vida. Por ejemplo, *Salmonella* pasa una parte importante de su ciclo de vida en el medio ambiente, compartiendo el hábitat con amebas. Estos organismos se alimentan principalmente de bacterias y hongos por fagocitosis y la digestión se produce dentro de fagolisosomas, un mecanismo antibacteriano similar al utilizado por macrófagos, como el proceso de autofagia. La autofagia es un mecanismo conservado en células eucariontes muy importante en la eliminación de proteínas mal plegadas y organelos dañados. La autofagia también desempeña un papel crucial durante la infección, actuando como un mecanismo de defensa contra patógenos intracelulares. Como consecuencia, muchos patógenos bacterianos han desarrollado la capacidad de evadir este proceso. La autofagia

está regulada por numerosas vías de señalización intracelular en las que participa la proteína ERK, vinculada a la vía de las MAPK, y la proteína AKT, vinculada a la vía PI3K/AKT/mTORC1. Cabe destacar que *Salmonella* tiene factores de virulencia que intervienen en vías de señalización intracelular en la célula hospedera. Por ejemplo, la proteína SopB de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) es una fosfatidilinositol fosfatasa que activa a AKT en células epiteliales, mientras que SptP es una proteína que tiene un dominio con actividad tirosina fosfatasa que regula negativamente a la proteína ERK en células epiteliales. Por su parte, PphB es una proteína no caracterizada con actividad serina/treonina fosfatasa hipotética.

En esta tesis, nos propusimos evaluar si los factores de virulencia SopB, SptP y PphB modulan el proceso de autofagia, contribuyendo en la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en la ameba *Dictyostelium discoideum* y en macrófagos murinos. Este estudio se llevó a cabo mediante ensayos de infección para evaluar la internalización y supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum* AX4 y en macrófagos RAW264.7. Además, se realizaron ensayos de infección con la finalidad de monitorear mediante microscopía confocal cómo *Salmonella* modula la autofagia en la ameba y los macrófagos mencionados. Finalmente, mediante ensayos de *western blot* detectamos las proteínas AKT, ERK1/2, mTOR y sus formas fosforiladas activas en células infectadas ya que éstas participan en vías de señalización intracelular que regulan la autofagia y que *Salmonella* podría controlar durante el proceso infeccioso.

Nuestros resultados indican que *S. Typhimurium* requiere de los factores de virulencia SopB, SptP y PphB para sobrevivir intracelularmente en la ameba

D. discoideum, pero no los requiere para sobrevivir en los macrófagos RAW264.7 bajo las condiciones experimentales utilizadas. Además, determinamos que los factores de virulencia SopB y SptP de *S. Typhimurium* modulan el proceso autofágico en la ameba *D. discoideum* y macrófagos RAW264.7. En macrófagos RAW264.7, SopB contribuye a la inhibición del proceso de autofagia tomando control de la vía AKT/mTORC1, mientras que SptP contribuye en la estimulación del proceso de autofagia de manera dependiente de AKT, pero independiente de mTORC1.

Considerando que las proteínas efectoras SopB, SptP y PphB son importantes para la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*, es válido pensar que *Salmonella* tomaría control de la autofagia con la finalidad de mantener un nicho replicativo estable y obtener nutrientes para su supervivencia intracelular en este hospedero. Finalmente, es importante destacar que en este trabajo de tesis se reporta por primera vez un rol para PphB en la virulencia de *Salmonella*. Además, es la primera vez que se reporta un rol para SopB, SptP y PphB en la internalización y supervivencia intracelular de *Salmonella* en protozoos.

7. SUMMARY

“Contribution of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence factors SopB, SptP and PphB to autophagy subversion in the amoeba *Dictyostelium discoideum* and murine macrophages”

Salmonella is a pathogenic bacteria that causes clinical manifestations ranging from self-limited gastroenteritis to systemic infections that can lead to the death of the host. The infective process of *Salmonella* begins with the ingestion of food or water contaminated with the bacteria, to later confront the intestinal epithelial cells, the first physical barrier of the host. It also has the ability to interact with professional phagocytic cells of the innate immune system, causing a local inflammatory response that ultimately results in the elimination of the bacteria in the environment. *Salmonella* has the ability to survive intracellularly in phagocytic cells such as macrophages, acting as vectors of systemic dissemination. Although the molecular mechanisms of this bacterium have been studied to survive within the macrophages, there is scarce information regarding the survival mechanisms used in other stages of its life cycle. For example, *Salmonella* spends an important part of its life cycle in the environment, sharing with amoebas. These organisms feed mainly on bacteria and fungi by phagocytosis and digestion occurs within phagolysosomes, an antibacterial mechanism similar to that used by macrophages, such as the autophagy process. Autophagy is a conserved mechanism in eukaryotic cells that is very important in the elimination of misfolded proteins and damaged organelles. Autophagy also plays a crucial role during infection, acting as a defense mechanism

against intracellular pathogens. As a consequence, many bacterial pathogens have developed the ability to evade this process. Autophagy is regulated by numerous intracellular signaling pathways involving the ERK protein, linked to the MAPK pathway, and the AKT protein, linked to the PI3K / AKT / mTORC1 pathway. It is worth mentioning that *Salmonella* has virulence factors that interfere with intracellular signaling pathways in the host cell. For instance, SopB protein of *S. Typhimurium* is a phosphatidylinositol phosphatase that activates AKT in epithelial cells, whereas SptP protein has a tyrosine phosphatase domain that negatively regulates the ERK protein in epithelial cells. For its part, PphB is an uncharacterized protein with hypothetical serine / threonine phosphatase activity.

In this thesis, we aimed to evaluate if the virulence factors SopB, SptP and PphB modulate the autophagy process, contributing to the intracellular survival of *S. Typhimurium* in the amoeba *Dictyostelium discoideum* and in murine macrophages. This study was carried out by means of infection assays to evaluate the internalization and intracellular survival of *S. Typhimurium* in *D. discoideum* AX4 and in RAW264.7 macrophages. In addition, infection assays were conducted with the purpose of monitoring by confocal microscopy how *Salmonella* modulates autophagy in the amoeba and in RAW264.7 macrophages. Finally, we detected AKT, ERK1/2, mTORC1 and their active phosphorylated forms in infected cells by western blot assays, as these proteins are linked to intracellular signaling pathways regulate autophagy and *Salmonella* could take control of them during infection.

Our results indicate that *S. Typhimurium* requires virulence factors SopB, SptP and PphB to survive intracellularly in the amoeba *D. discoideum*. In contrast, the pathogen does not require these virulence factors to survive in RAW264.7 macrophages under the experimental conditions used. In addition, we determined that virulence factors SopB and SptP of *S. Typhimurium* modulate the autophagy process in the amoeba *D. discoideum* and RAW264.7 macrophages. In these macrophages, SopB contributes to the inhibition of autophagy by taking control of the AKT / mTORC1 pathway, while SptP contributes to the stimulation of autophagy in an AKT-dependent manner, but independent of mTORC1.

Taking into consideration that effector proteins SopB, SptP y PphB are important for intracellular survival of *S. Typhimurium* in *D. discoideum*, one can argue that *Salmonella* takes control of autophagy in order to maintain a stable replicative niche and obtain nutrients for its intracellular survival in this host. Finally, it is important to mention that in this thesis we reported for the first time a role for PphB in the virulence of *Salmonella*. In addition, we reported for the first time a role for SopB, SptP and PphB in the internalization and intracellular survival of *Salmonella* in protozoa.

8. INTRODUCCIÓN

8.1. Género *Salmonella*

El género *Salmonella* está compuesto por dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, las cuales a su vez están compuestas por más de 2500 serovares según su variación antigénica en el lipopolisacárido (antígeno O) y el flagelo (antígeno H). Además, *S. enterica* se divide en seis subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI) (Le Minor et al. 1986; Reeves et al. 1989). Sólo los serovares de la subespecie *enterica* (I) causan enfermedad en animales homeotermos (Anjum et al. 2005; Porwollik and McClelland 2003). Algunos de estos serovares son capaces de colonizar y causar enfermedad en diferentes animales, por lo que se denominan “serovares generalistas” (Feasey et al. 2012). Ejemplos de éstos incluyen a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) y *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*). Generalmente, estos serovares causan una gastroenteritis autolimitada, aunque *S. Typhimurium* produce una enfermedad sistémica (fiebre entérica) en ratones BALB/c. Por otro lado, los serovares *S. Typhi* y *S. Paratyphi A* infectan exclusivamente al ser humano (Carter and Collins 1974; Feasey et al. 2012), por lo que se les denomina “serovares especialistas”. Otros ejemplos de este tipo de serovares incluyen a *S. Gallinarum*, *S. Dublin*, *S. Choleraesuis* y *S. Abortusovis*, los cuales infectan exclusivamente a gallinas, bovinos, porcinos y ovinos, respectivamente (Carter and Collins 1974).

La infección con *Salmonella* comienza con el consumo de alimentos o aguas contaminadas. Luego, la bacteria supera la barrera ácida del estómago y accede al intestino delgado, donde atraviesa las células M de las placas de Peyer o invade las células epiteliales en la región distal del íleon mediante el sistema de secreción de tipo 3 codificado en la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (SST3_{SPI-1}) y sus proteínas efectoras, para luego llegar al tejido linfoide subyacente induciendo la inflamación del tejido intestinal (Hansen-Wester and Hensel 2001; Haraga et al. 2008). En este punto se produce una diferencia en los cuadros clínicos causados por los serovares *S. Typhi* y *S. Typhimurium* en humanos. En el caso de *S. Typhimurium*, la bacteria permanece circunscrita en el intestino produciendo una gastroenteritis autolimitada. Por su parte, *S. Typhi* es capaz de diseminarse por el torrente sanguíneo al interior de los macrófagos mediante el sistema de secreción de tipo 3 codificado en la isla de patogenicidad 2 de *Salmonella* (SST3_{SPI-2}), causando una enfermedad sistémica llamada fiebre tifoidea. Durante su proceso infectivo, *Salmonella* se enfrenta a dos etapas fundamentales: (1) la invasión del epitelio intestinal y (2) la supervivencia intracelular en macrófagos y otras células fagocíticas, lo que contribuye a su diseminación sistémica en el hospedero (Hansen-Wester and Hensel 2001; Haraga et al. 2008). En cuanto a la invasión y la supervivencia intracelular, *Salmonella* presenta numerosas proteínas que se expresan en momentos particulares de la infección y presentan funciones que modulan los procesos fisiológicos de la célula hospedera, y protegen a la bacterias de las condiciones adversas intracelulares, para finalmente llevar a cabo un ciclo infectivo exitoso (**Figura 1**) (Godaly et al. 1998; Haraga et al. 2008; Sabbagh et al. 2012).

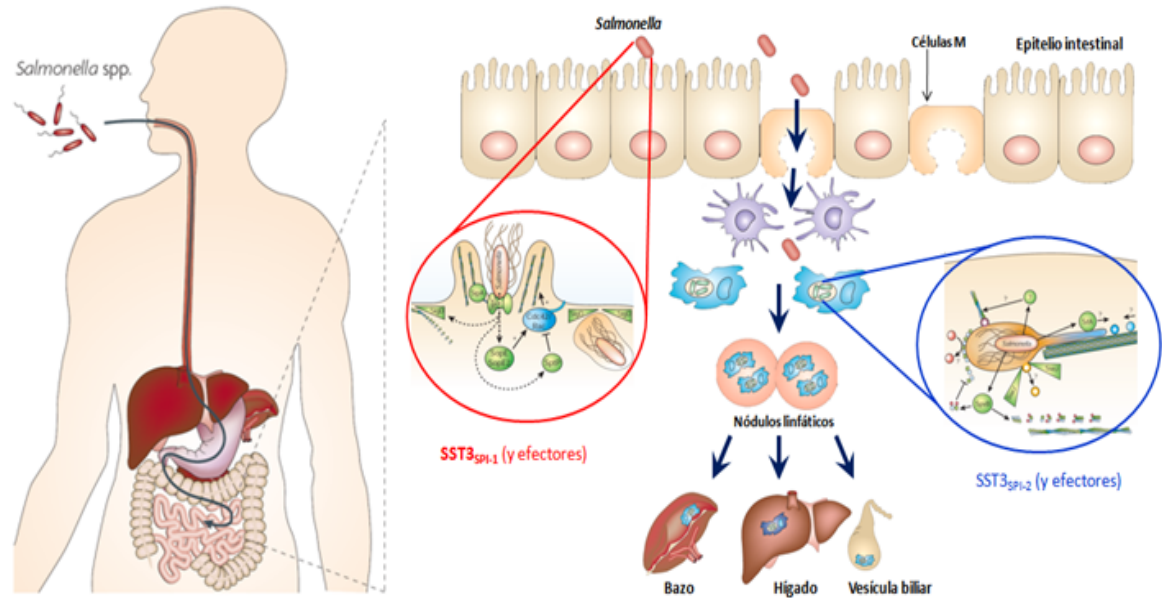


Figura 1. Proceso infeccioso de *Salmonella*. El proceso infeccioso de *Salmonella* comienza con el consumo de alimentos o agua contaminados con esta bacteria, la que posteriormente logra sobrevivir al pH ácido del estómago y los mecanismos de defensa presentes en el intestino delgado para luego cruzar la barrera epitelial a través de las células M o induciendo su propia internalización en células epiteliales mediante el SST3_{SPI-1} y sus proteínas efectores. Una vez que cruza el epitelio, *Salmonella* interactúa con células del sistema inmune innato como macrófagos, siendo capaz de sobrevivir en su interior mediante el SST3_{SPI-2} y sus efectores. De esta manera, *Salmonella* utiliza estas células para diseminarse de forma sistémica. Modificado de (Haraga et al. 2008).

En todo el mundo, los serovares de *Salmonella* son responsables de cientos de millones de casos de salmonelosis y cientos de miles de muertes asociadas a esta patología (CDC 2005). La fiebre tifoidea es una enfermedad sistémica causada por serovares como *S. Typhi* y *S. Paratyphi A* que puede alcanzar un 30% de mortalidad en pacientes no tratados y puede generar un 6% de portadores crónicos. No es frecuente en países desarrollados, pero es endémica en países en desarrollo y subdesarrollados. La enfermedad sistémica y bacteremia también puede resultar de infecciones con serovares no tifoideos de *Salmonella* (SNT), como *S. Typhimurium*. En este caso, niños menores a 5 años, ancianos e inmunocomprometidos tienen un alto riesgo de desarrollar una

salmonelosis sistémica fatal posterior a la infección con SNT. Aunque las SNT son la causa más frecuente de muerte asociada con agentes infecciosos transmitida por alimentos en países subdesarrollados, el número total de este tipo de casos en los países desarrollados es relativamente bajo (Gordon et al. 2002; Kankwatira et al. 2004).

8.2. Factores de virulencia de *Salmonella*

Generalmente en la transferencia horizontal de material genético, estos quedan circunscritos en islas genómicas. Las islas genómicas son secuencias de DNA de tamaño variable que se caracterizan por encontrarse insertas en la vecindad de genes que codifican tRNAs, estar flanqueadas por secuencias repetidas directas y poseer un contenido de G+C distinto al promedio del genoma y algunas islas contienen remanentes de elementos genéticos móviles, como genes que codifican integrasas y transposasas. Además, la transferencia horizontal de genes puede resultar en la adquisición de nuevas funciones por parte de la bacteria, lo cual podría generar ciertas ventajas adaptativas en el hospedero, como genes cuyos productos proteicos tienen funciones que contribuyen a la virulencia de la bacteria, los que son llamados como factores de virulencia. En tal caso, estas islas genómicas se denominan islas de patogenicidad. Todas estas características indican que estas regiones del genoma han sido adquiridas por las bacterias a través de transferencia horizontal (Hacker and Carniel 2001; Hansen-Wester et al. 2004; Ochman and Groisman 1996).

Mediante estudios genéticos y de genómica comparativa, se han identificado al menos 24 islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI) (Desai et al. 2013; Fookes et al.

2011; Urrutia et al. 2014). Las islas SPI-1 y SPI-2 son esenciales para el proceso infeccioso y están presentes en todos los miembros de la especie *S. enterica*. Tanto SPI-1 como SPI-2 codifican sistemas de secreción de tipo 3 (SST3_{SPI-1} y SST3_{SPI-2}, respectivamente), los cuales transfieren proteínas conocidas como “efectores” desde el citoplasma bacteriano directamente a la célula hospedera. El SST3_{SPI-1} se activa en el intestino y al contacto con los enterocitos, translocando efectores que alteran la estructura del citoesqueleto activando o reprimiendo GTPasas de la familia Rho en la célula hospedera (**Figura 2**) (Haraga et al. 2008). La reorganización del citoesqueleto ocurre dentro de la primera hora de infección, generando ondulaciones de la membrana citoplasmática que envuelven a la bacteria, la cual queda internalizada dentro de un compartimiento intracelular llamado “vacuola contenedora de *Salmonella*” (VCS). Posteriormente, *Salmonella* modifica el tráfico vesicular evitando la fusión de la VCS con los lisosomas y luego ocurre una maduración de estas vacuolas donde la bacteria logra establecerse. Para este proceso se requiere el SST3_{SPI-2} y sus efectores (**Figura 2**) (Haraga et al. 2008), por lo que esta isla de patogenicidad es esencial para la supervivencia y multiplicación de la bacteria en el medio intracelular, tanto en células epiteliales y especialmente en macrófagos, y para su posterior diseminación sistémica en el hospedero (Garai et al. 2012; Haraga et al. 2008; Patel and Galán 2006).

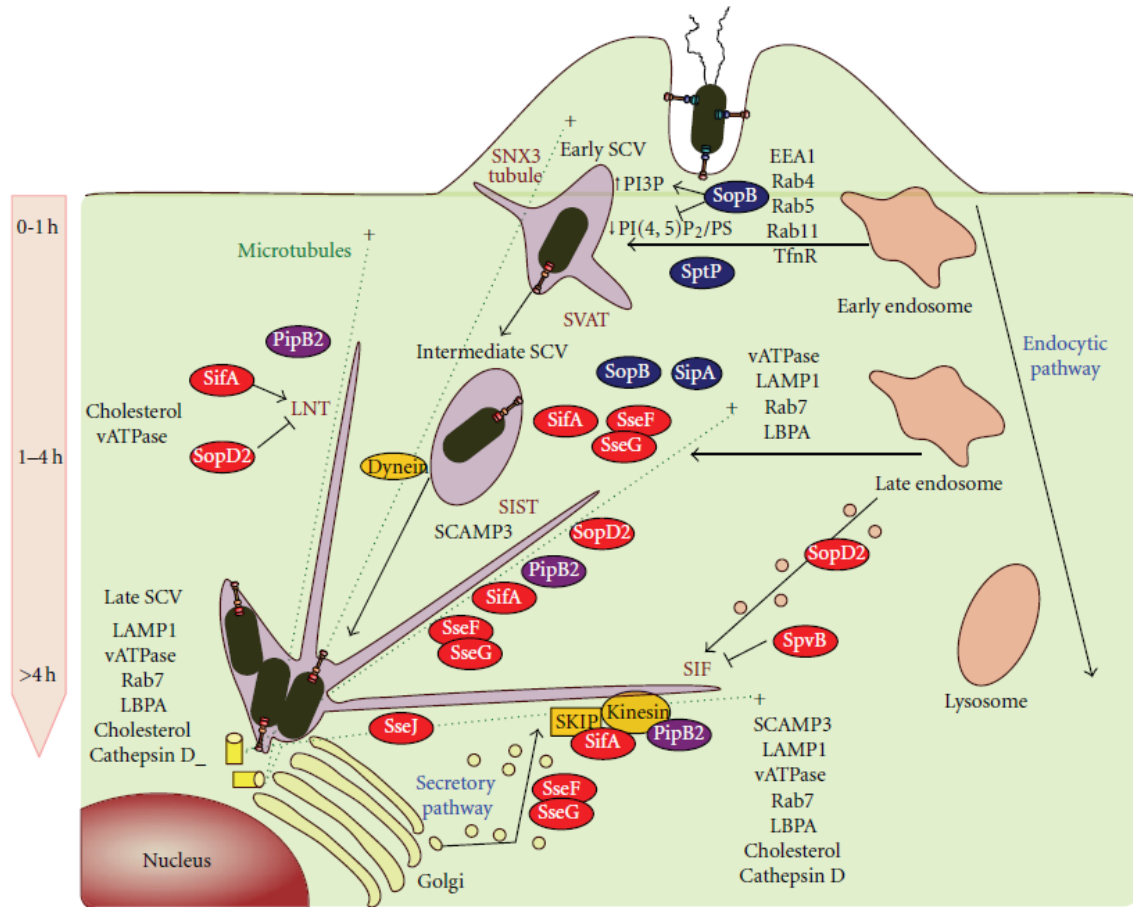


Figura 2. Cambios que inducen las proteínas efectoras del SST3_{SPI-1} y SST3_{SPI-2} de *Salmonella* en la célula hospedadora. La figura muestra algunas de las proteínas efectoras de los SST3_{SPI-1} y SST3_{SPI-2} que modulan los procesos fisiológicos de la célula hospedadora. La etapa inicial (0-1 h) está controlada por los efectores SopB y SptP del SST3_{SPI-1}. La etapa intermedia de desarrollo (1-4 h) requiere la participación de los efectores SipA y SopB del SST3_{SPI-1} y los efectores SifA, SseF y SseG del SST3_{SPI-2}, para permitir el movimiento del VCS a una posición juxtannuclear. La replicación bacteriana se inicia 4-6 h después de la invasión. Los efectores del SST3_{SPI-2} se representan en rojo, los efectores del SST3_{SPI-1} se representan en azul y los efectores que pueden secretarse a través de ambos SST3 se representan en púrpura (Ramos-Morales 2012).

8.3. Interacción *Salmonella*-amebas

Aunque *Salmonella* es un patógeno intracelular facultativo, pasa una parte significativa de su ciclo de vida en el medio ambiente compartiendo su hábitat con una variedad de protozoos depredadores, incluyendo a las amebas. Estos organismos se

alimentan principalmente de bacterias y hongos mediante fagocitosis y la digestión se produce dentro de fagolisosomas. Para escapar de esta depredación, muchas bacterias han desarrollado mecanismos sofisticados para sobrevivir y replicarse intracelularmente en amebas. Además, el nicho intracelular de las amebas protege a las bacterias de ciertas condiciones ambientales adversas. Como resultado de este proceso, las amebas pueden actuar como reservorios ambientales para la proliferación y la transmisión de bacterias patógenas a animales y seres humanos. El estudio de las interacciones entre bacterias y amebas ha ganado importancia desde que se descubrió que *Legionella pneumophila* se replica dentro de *Acanthamoeba polyphaga* (Rowbotham 1980). Desde entonces, la interacción de *L. pneumophila* con amebas de vida libre se ha estudiado a fondo. De hecho, se ha reportado que este patógeno emplea un conjunto similar de genes para sobrevivir en las amebas y en los macrófagos humanos (Gao et al. 1997; Segal and Shuman 1999). También se ha reportado que bacterias como *Escherichia coli*, *Mycobacterium avium*, *Chlamydia pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas aeruginosa*, entre otras, pueden sobrevivir o replicarse dentro de *Acanthamoeba* (Barker et al. 1999; Cirillo et al. 1997; Essig et al. 1997; Ly and Muller 1990; Marolda et al. 1999; Strassmann and Shu 2017). Uno de los primeros estudios sobre la interacción de *Salmonella* con amebas demostró que *S. Typhimurium* es capaz de sobrevivir intracelularmente en *Acanthamoeba polyphaga* dentro de vesículas (Gaze et al. 2003). Esta observación sugirió que las amebas pueden jugar un papel importante en la ecología de *Salmonella* en el medio ambiente. Posteriormente, diversos estudios establecieron que diferentes serovares de *Salmonella* pueden interactuar y sobrevivir dentro de una variedad de amebas, incluyendo distintas especies de *Acanthamoeba*, *Tetramitus*, *Naegleria* y *Hartmannella* (Bleasdale et al. 2009; Feng et al. 2009; Tezcan-Merdol et al. 2004;

Wildschutte and Lawrence 2007; Wildschutte et al. 2004). En unos pocos casos, los autores informaron que algunas amebas pueden diferenciar entre serovares de *Salmonella* (Tezcan-Merdol et al. 2004; Wildschutte et al. 2004) y que su internalización se asocia con efectos citotóxicos (Feng et al. 2009; Tezcan-Merdol et al. 2004).

En cuanto a otras amebas, *Dictyostelium discoideum* es una ameba ambiental susceptible a la invasión de bacterias patógenas que comúnmente infectan hospederos animales. Este organismo es fácil de cultivar en el laboratorio y en él se pueden aplicar distintas técnicas de biología celular, genética y bioquímica, permitiendo que sea ampliamente usado como hospedero modelo para estudiar la interacción entre amebas y bacterias patógenas (Bozzaro and Eichinger 2011; Steinert 2011). Al ser un fagocito profesional, puede ser infectado por distintas bacterias, comprobándose que diferentes factores de virulencia relevantes para la infección en mamíferos también son importantes para su interacción con esta ameba (Bozzaro and Eichinger 2011; Steinert 2011). Respecto a su relación con *Salmonella*, inicialmente se describió que *S. Typhimurium* no era capaz de sobrevivir en esta ameba (Skriwan et al. 2002). Posteriormente, se informó que mutantes de *D. discoideum* en las que se inactivan genes relacionados con el proceso de autofagia permiten la supervivencia y replicación intracelular de *S. Typhimurium*, sugiriendo que la autofagia es un mecanismo de defensa contra este patógeno (Jia et al. 2009). Un estudio más reciente demostró que *S. Typhimurium* es patógeno para *Dictyostelium* y altera la respuesta de autofagia de la ameba (Sillo et al. 2011). Además, la virulencia de *Salmonella* sobre *Dictyostelium* dependía de las condiciones de crecimiento de las bacterias (Sillo et al. 2011). Por lo tanto, *Dictyostelium* es ahora considerado como un modelo adecuado para estudiar la interacción *Salmonella*-amebas

Sorprendentemente, sólo unos pocos estudios se han realizado con el fin de comprender los mecanismos moleculares empleados por *Salmonella* para interactuar y sobrevivir dentro de amebas. En uno de estos estudios, se evaluaron los efectos del plásmido de virulencia de *Salmonella* (SVP) y de HilA, un regulador de la expresión de genes de la SPI-1, sobre la replicación, supervivencia y citotoxicidad de *S. Dublin* sobre *Acanthamoeba rhysodes* (Tezcan-Merdol et al. 2004). Los autores comprobaron que tanto la SPI-1 como el SVP son importantes para la replicación, supervivencia intracelular y citotoxicidad de *S. Dublin* en *A. rhysodes* durante una incubación prolongada (Tezcan-Merdol et al. 2004). Un segundo estudio evaluó el papel desempeñado por SPI-1, SPI-2 y el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ (que regula la expresión de muchos genes de virulencia en *Salmonella*, incluyendo algunos localizados en SPI-1 y SPI-2) en la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *A. polyphaga* (Bleasdale et al. 2009). Los resultados de este estudio demostraron que PhoP/PhoQ y SPI-2 son esenciales para la supervivencia de *S. Typhimurium* en esta ameba de vida libre. En contraste, SPI-1 demostró ser prescindible para este proceso (Bleasdale et al. 2009). Por otro lado, en nuestro laboratorio se ha evaluado el rol de distintos factores de virulencia de *S. Typhimurium* en su interacción con esta ameba. En estos trabajos se ha reportado que los SST3_{SPI-1} y SST3_{SPI-2}, además del sistema de translocación de proteínas *twin-arginine translocation* (TAT), contribuyen en la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum* (Riquelme et al. 2016; Urrutia et al. 2018). Estas observaciones indican que los genes implicados en la interacción de *Salmonella* con células hospederas también son necesarios para su interacción con amebas de vida libre. Además, sugieren fuertemente que *S. Typhimurium* utiliza un conjunto común de genes para sobrevivir dentro de amebas y macrófagos.

Además de los estudios mencionados, se han realizado estudios sobre el perfil de expresión de genes de *Salmonella* dentro de amebas. En uno de ellos se investigó el perfil transcripcional de *S. Choleraesuis* dentro de *A. rhysodes* y se identificaron genes expresados diferencialmente entre bacterias intracelulares y extracelulares (en diferentes momentos después de la infección) mediante hibridaciones de RNA en *microarrays* y qRT-PCR (Feng et al. 2009). Los resultados de este estudio indican que genes codificados en SPI-1, SPI-4 y SPI-5 se expresaron en niveles superiores a 12 h post infección que a 2 y 8 h post infección, mientras que genes codificados en SPI-2, SPI-3, SPI-9 y SPI-11 se expresaron en un nivel superior a 2 h post infección que a 8 y 12 h post infección. Estos patrones de expresión sugieren papeles temporales para los diferentes genes durante la interacción de *Salmonella* con amebas (Feng et al. 2009). Más recientemente, el perfil transcripcional de *S. Typhimurium* se ha estudiado cuando la bacteria reside dentro de fagosomas del protozoo *Tetrahymena* (Rehfuss et al. 2011). Cabe destacar que muchos genes necesarios para la supervivencia y proliferación de *Salmonella* dentro de macrófagos y células epiteliales humanas mostraron un aumento de su expresión en *Tetrahymena*. Éstos incluyen genes regulados por PhoP/PhoQ, como *pagC*, *pagK*, *virK*, *mgtB* y *mgtC*, y genes que codifican componentes del SST3^{SPI-2} y algunos de los efectores secretados a través de él, entre otros. En conjunto, las observaciones de estos análisis transcriptómicos refuerzan la idea que *Salmonella* requiere un conjunto común de genes para sobrevivir intracelularmente en protozoos y macrófagos.

Respecto a los roles que cumplen estos dos tipos de células fagocíticas, protozoos y macrófagos, es importante destacar que los macrófagos fagocitan bacterias dentro de organismos hospederos. De esta forma, pueden convertirse en reservorios de bacterias

patógenas intracelulares como *Salmonella*, actuando como vectores de diseminación sistémica en el organismo. Este es el caso de la fiebre tifoidea causada por *S. Typhi* en el hospedero humano. Por su parte, los protozoos fagocitan bacterias en el medio ambiente, pudiendo servir como reservorios de bacterias patógenas intracelulares y, de esta manera, transformarse en vectores de diseminación ambiental. Si bien se ha estudiado ampliamente los mecanismos moleculares implicados en la supervivencia intracelular de *Salmonella* en macrófagos, hay pocos estudios en cuanto a la interacción y mecanismos de supervivencia de *Salmonella* en protozoos.

8.4. Autofagia

La autofagia es un proceso celular altamente conservado en el que componentes citoplasmáticos son degradados en lisosomas. Este proceso involucra una compleja interacción de más de 36 proteínas que fueron caracterizadas inicialmente en levaduras y que se denominaron proteínas Atg (*Autophagy*), las que funcionan de manera coordinada para encapsular material citoplasmático en una vesícula de doble membrana llamada “autofagosoma”, la cual se fusiona con los lisosomas para formar “autolisosomas”. De esta manera, la autofagia es usada por las células para reciclar componentes citoplasmáticos y generar energía bajo condiciones de estrés. Además, funciona como un mecanismo de control de calidad, eliminando agregados de proteínas (agrefagia) y organelos dañados, como mitocondrias (mitofagia), ribosomas (ribofagia) y peroxisomas (peroxifagia), entre otros, con el fin de mantener la homeostasis celular (Feng et al. 2014). Interesantemente, se ha demostrado que las células también utilizan la autofagia para la eliminación de patógenos intracelulares (xenofagia) (Cemma and Brumell 2012).

Hoy en día, el proceso de autofagia se puede categorizar en tres grandes grupos según cómo el lisosoma degrada el material intracelular. (1) En primer lugar se encuentra la “macroautofagia”, comúnmente referida como “autofagia”, que involucra un reordenamiento dinámico de membranas que implica el secuestro de proteínas, organelos y citoplasma en vesículas citosólicas de doble membrana. Estas vesículas son llamadas “autofagosomas” y se forman a partir de una estructura pre-autofagosomal llamada “fagoforo” (**Figura 3**). A diferencia de la degradación proteosomal, la autofagia implica la fusión de estructuras vacuolares, donde el autofagosoma se fusiona con el lisosoma y el contenido intravesicular es liberado hacia el lumen lisosomal, degradándose por medio de las proteasas lisosomales (Mizushima and Klionsky 2007; Yorimitsu and Klionsky 2005). Por otro lado, (2) en la “microautofagia” es el lisosoma quien engloba directamente los diferentes blancos a degradar (proteínas y organelos) sin la necesidad de estar contenidos en vacuolas (Todde et al. 2009; Yorimitsu and Klionsky 2005). Por último, (3) en la “autofagia mediada por chaperonas”, la proteína chaperona Hsc70 forma un complejo con proteínas blanco a degradar. Esto permite dirigir dicho complejo hacia el lisosoma, donde la proteína lisosomal Lamp2A sirve como un adaptador y receptor, permitiendo el ingreso de las proteínas blanco al lisosoma para su degradación (Majeski and Dice 2004; Massey et al. 2006).

El mecanismo autofágico mejor descrito es la macroautofagia que ocurre en mamíferos (**Figura 3**). Este proceso se inicia con la nucleación y maduración del fagoforo, compartimento de doble membrana que posteriormente contendrá material citoplasmático generando el autofagosoma. La inducción de la autofagia requiere un cambio en el estado de fosforilación de ULK1, Atg13 y otras proteínas como FIP200 (**Figura 3**) (Kaur and

Debnath 2015), las cuales forman el complejo de preiniciación activo (complejo PAS), el cual controla la activación del complejo de iniciación formado por Vps34, Vps15, Beclin 1, Ambra 1, Atg14 (o UVRAG) y BIF1 (**Figura 3**). Vps34 corresponde a un complejo fosfatidilinositol-3 quinasa de tipo 3 (PI3K de tipo 3) encargado de generar fosfatidilinositol-3-fosfato, lo que inicia la elongación y nucleación de la doble membrana que va a formar los autofagosomas (Kaur and Debnath 2015). Dos sistemas de conjugación similares al sistema de ubiquitinación son parte del proceso de elongación de la vesícula (**Figura 3**) (Kaur and Debnath 2015). Por un lado, se requiere del sistema de conjugación Atg12 que permite la unión covalente de Atg12 a Atg5 con la ayuda de Atg7 y Atg10, enzimas tipo E1 ligasa y E2 ligasa, respectivamente. El conjugado Atg12-Atg5 interactúa no covalentemente con Atg16L1 formando un complejo que puede actuar como ligasa tipo E3 para promover la segunda reacción de conjugación. Esta segunda reacción de conjugación es llevada a cabo por el sistema de conjugación de LC3 (o Atg8 en levaduras) e involucra la adición de fosfatidiletanolamina (PE) a LC3 por la acción secuencial de las proteasas Atg4, Atg7 y Atg3. La conjugación de PE convierte a LC3-I en LC3-II, lo que le permite quedar anclada a la membrana del fagoforo. Durante la expansión del fagoforo, se cree que el complejo Atg9-Atg2-WIPI1 y/o WIPI2 tendría el rol de proporcionar nuevas membranas al fagoforo creciente, permitiendo ciclar a Atg9 entre el sitio de expansión y el sitio dador de membrana. Una vez que el autofagosoma está completo, las proteínas Atg que están asociadas al fagoforo son liberadas al citoplasma y reutilizadas para la biogénesis de nuevas vesículas (**Figura 3**) (Kaur and Debnath 2015). Los autofagosomas maduran por la fusión con los lisosomas, para crear los autofagolisosomas, donde la membrana interna y el contenido es degradado por las enzimas lisosomales (**Figura 3**) (Kaur and Debnath 2015).

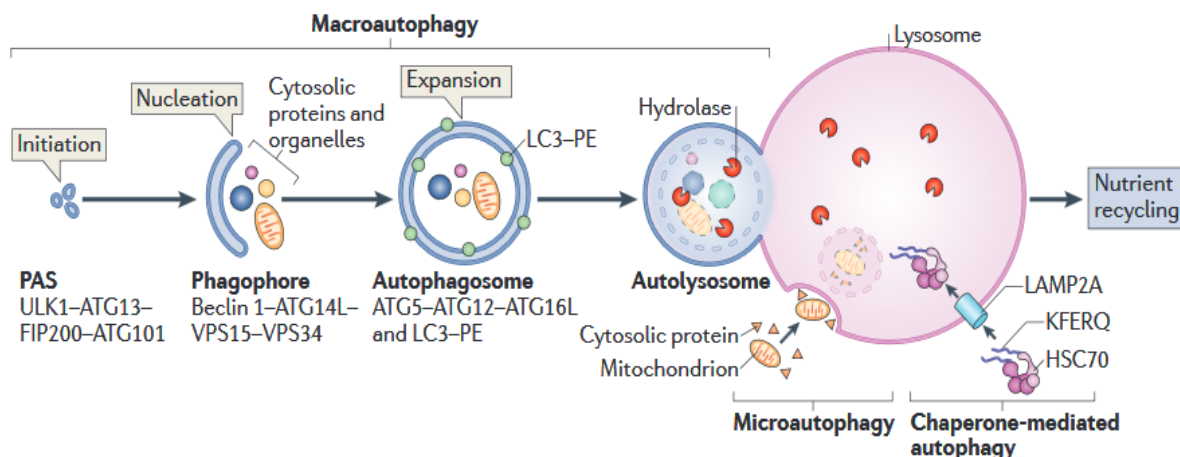


Figura 3. Maquinaria molecular del proceso de autofagia. En la macroautofagia, la etapa de iniciación comienza con la formación del sitio de ensamblaje del fagóforo (PAS). Esto está mediado por el complejo ULK (ULK1, ATG13, FIP200 y ATG101). La nucleación adicional requiere el complejo PI3K de tipo 3 (VPS34, ATG14L, VPS15 y Beclin 1). La elongación del fagoforo y la maduración del autofagosoma requieren dos vías de conjugación tipo ubiquitina. El primero produce el conjugado ATG5-ATG12, que forma un complejo multimérico con ATG16L, mientras que el segundo produce la conjugación de fosfatidiletanolamina (PE) a LC3. LC3 conjugado con PE (LC3-PE o LC3-II) es necesario para la expansión de las membranas autofágicas y su capacidad para reconocer material citoplasmático y la fusión de los autofagosomas con lisosomas, lo que finalmente conduce a la formación del autolisosoma para degradar el material contenido y ser reciclado por la célula. Por otro lado, en la microautofagia el lisosoma es quien engloba directamente los diferentes blancos a degradar mientras que en la autofagia mediada por chaperonas, la proteína chaperona Hsc70 forma un complejo con los blancos para luego ser llevados al lisosoma para ser degradados (Kaur and Debnath 2015).

Hasta la fecha, LC3 es la proteína más usada para estudiar autofagia, siendo considerada clásicamente como un marcador de autofagosomas (Klionsky et al. 2016), debido a que permanece anclada a la membrana de este compartimento durante gran parte del proceso autofágico. Como se ha mencionado, una vez que se ha activado la autofagia se inicia una serie de reacciones de conjugación que derivan en la adición de PE a LC3 (LC3-II). Esto le permite anclarse a la membrana del autofagosoma, permaneciendo unido a este compartimento hasta su fusión con los lisosomas (Füllgrabe et al. 2014). En base a lo anterior, los estudios clásicos de autofagia acostumbran determinar mediante *western*

blot la presencia de esta proteína, tanto en su forma no lipidada (LC3-I) como en su forma lipidada (LC3-II) (Klionsky et al. 2016).

En cuanto a la regulación de la autofagia, este proceso está finamente regulado por distintas vías de señalización intracelular, siendo clave el rol que cumple mTOR sobre este proceso. mTOR es una serina/treonina quinasa que puede formar parte de dos complejos. El primer complejo, mTORC1, está compuesto por mTOR, Raptor, GbL y DEPTOR, mientras que el segundo complejo, mTORC2, está compuesto por mTOR, Rictor, GbL, Sin, PRR5/Proctor-1 y DEPTOR. mTORC1 regula las vías que coordinan el balance entre el crecimiento celular y la autofagia en respuesta al estado nutricional, factores de crecimiento y señales de estrés. En mamíferos, mTORC1 regula negativamente la autofagia ya que al estar activo hiper fosforila a ULK 1/2 y Atg13, lo que inhibe la actividad quinasa de ULK 1/2 impidiendo el inicio de la autofagia (**Figura 4**) (Jung et al. 2010). Cuando mTORC1 es inhibido no ocurre la fosforilación sobre ULK 1/2, lo que permite que este último fosforile a Atg13, FIP200 y a sí mismo, provocando la activación de la maquinaria autofágica (Jung et al. 2010).

El control de la autofagia se puede llevar a cabo actuado a nivel del complejo TSC 1/2, el cual actúa como una proteína activadora de GTPasas para RHEB, siendo esta proteína la que activa a mTORC1 llevando a la inhibición de la autofagia (**Figura 4**). Otro regulador importante de la autofagia es la proteína quinasa activada por AMP (AMPK). Cuando existen bajos niveles de energía (ATP), causados por condiciones de estrés o en escasez de nutrientes, ocurre un aumento en la relación AMP/ATP, lo que deriva en la activación de AMPK. AMPK activa fosforilando directamente a proteínas como TSC 1/2,

IRS1, Raptor y ULK1 (**Figura 4**), afectando al proceso de autofagia (Hirao and Hoshii 2013). Así, AMPK puede tener una acción indirecta sobre mTORC1 activando al complejo TSC 1/2 (Inoki et al. 2003), o puede inhibirlo directamente fosforilando a Raptor, lo que finalmente conduce a la activación de la autofagia (Hirao and Hoshii 2013).

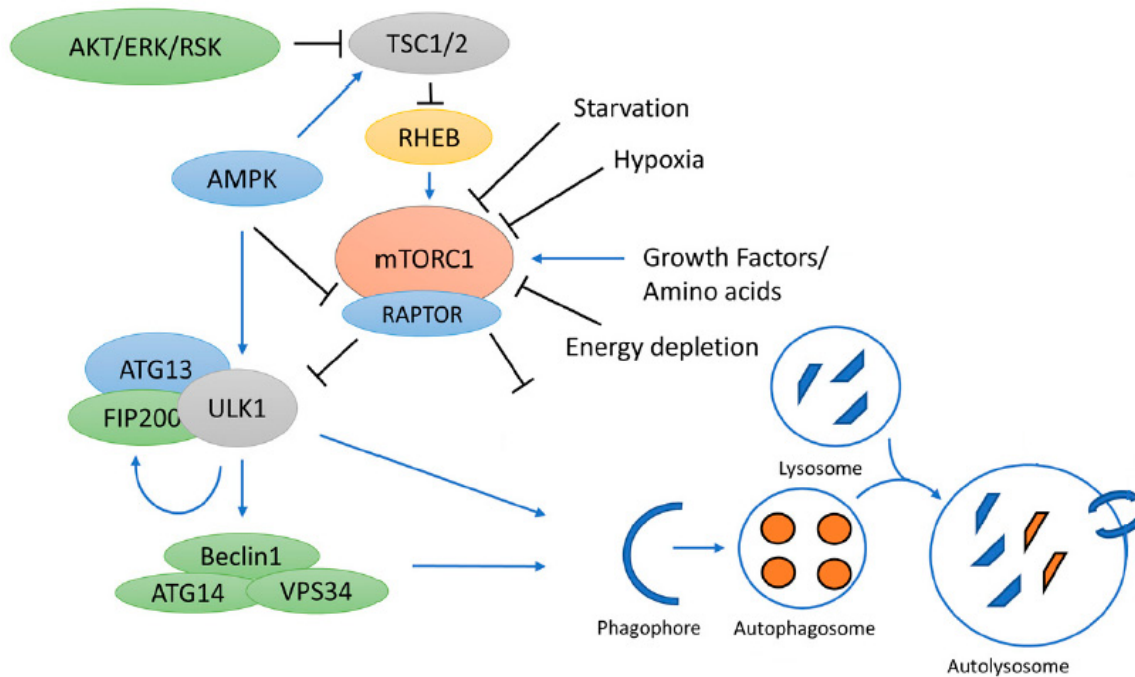


Figura 4. Vías de señalización intracelular que regulan la autofagia. El blanco de la rapamicina (mTORC1) es el principal complejo de control para la autofagia. Una amplia gama de señales, como factores de crecimiento y aminoácidos, regulan a mTORC1 al inhibir el complejo de esclerosis Tuberosa 1 y 2 (TSC 1/2), evitando así el efecto inhibitorio de TSC 1/2 en el homólogo de Ras enriquecido en el cerebro (RHEB), que posteriormente activa a mTORC1. Por su parte, la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) también inhibe a mTORC1 a través de la inhibición de la proteína reguladora asociada de mTOR (Raptor). En condiciones normales con disponibilidad de nutrientes, mTORC1 suprime la autofagia mediante la inhibición dependiente de la fosforilación de Unc-51 como la quinasa activadora de autofagia (ULK1). La activación de ULK1 promueve el inicio de la autofagia y la maduración del autophagosoma. Por otro lado, la proteína quinasa B (PKB/AKT) y la proteína quinasa activada por mitogeno (ERK) también cumplen un rol importante río arriba de mTORC1 inhibiendo al complejo TSC 1/2 y generando posteriormente la activación de mTORC1. Modificado de (Paquette et al. 2018).

Por otro lado, en respuesta a factores de crecimiento se pueden activar distintas vías, como la vía PI3K-AKT, generando la inactivación del complejo TSC 1/2, el cual actúa como una proteína activadora de GTPasas para RHEB, siendo esta proteína la que activa a mTORC1 llevando a la inhibición de la autofagia (**Figura 4**). El complejo TSC 1/2 también puede ser regulado por otras quinasas, como ERK1/2, cuya acción también lleva a una inactivación del proceso autofágico (**Figura 4**) (Helgason et al. 2013). Para esto, la señalización de Ras cumple un rol importante en la regulación de la autofagia, ya que puede inhibir la autofagia activando una de las vías de las MAPK (Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2), aunque también se ha visto una comunicación cruzada con la vía PI3K-AKT, donde Ras contribuye en el reclutamiento de PI3K a la membrana, generando la activación de AKT, inhibiendo así a TSC 1/2 para posteriormente activar a mTORC1 a través de RHEB y finalmente inactivar la autofagia (**Figura 4**) (Paquette et al. 2018; Wang et al. 2009).

8.5. Autofagia en *Dictyostelium discoideum*

Cabe destacar que la ameba *Dictyostelium discoideum* es un buen modelo para estudiar numerosos procesos fisiológicos, incluida la autofagia. Se ha demostrado que en este organismo ocurre un proceso muy similar al de mamíferos, identificándose ortólogos para todas las proteínas esenciales relacionadas con la maquinaria autofágica. De hecho, esta ameba posee proteínas de los complejos Atg1, PI3K de tipo 3 y de los 2 sistemas de conjugación (Calvo-Garrido et al. 2011), además de contar con muchas de las proteínas centrales en las vías de señalización que regulan este proceso, como AKT, AMPK,

mTORC1 y ERK (Calvo-Garrido et al. 2010; Calvo-Garrido et al. 2014; Francione et al. 2009; Hadwiger and Nguyen 2011; Nguyen et al. 2010).

En los últimos años se han implementado con éxito muchas técnicas para estudiar el proceso de la autofagia en *Dictyostelium*, evaluándose tanto el estado autofágico de la célula como la progresión desde los autofagosomas hasta su fusión con los lisosomas, proceso que se conoce como “flujo autofágico”. En el caso específico de *Dictyostelium*, para marcar los autofagosomas se puede expresar el marcador de autofagia LC3 fusionado a proteínas fluorescentes, las cuales permiten evaluar el estado autofágico de la célula mediante el uso de microscopía confocal. Por ejemplo, la proteína de fusión GFP-LC3 permite marcar los autofagosomas desde su elongación hasta su degradación (Otto et al. 2003).

Asimismo, en esta ameba se han logrado implementar un par de técnicas para monitorear el flujo autofágico. Se ha desarrollado una técnica que permite seguir la progresión de la autofagia mediante la visualización del marcador RFP-GFP-LC3. Cuando este marcador se encuentra en los lisosomas, el ambiente ácido de este organelo apaga la fluorescencia de GFP (su fluorescencia es más sensible al pH ácido), mientras que la fluorescencia de RFP se preserva por más tiempo. De esta forma, al analizarse esta señal por microscopía confocal y detectarse sólo la señal roja, se evidencia la acidificación del autofagosoma por su fusión con los lisosomas (Calvo-Garrido et al. 2011). La segunda técnica, utiliza una mezcla de inhibidores de proteasas en altas concentraciones para inhibir las enzimas degradativas de los lisosomas y así bloquear la autofagia (Cardenal-Muñoz et al. 2017). De esta manera, mediante microscopía confocal, podremos comparar

una cepa de *Dictyostelium* que expresa el marcador GFP-LC3 cuando es tratada con la mezcla de inhibidores de proteasas versus cuando no es tratada. Al igual que el criterio de utilizar cloroquina en células de mamífero, si aumenta el número de autofagosomas al utilizar los inhibidores significa que la autofagia es activa, lo que implica que los autofagosomas se fusionan finalmente con los lisosomas (Cardenal-Muñoz et al. 2017).

8.6. Autofagia como mecanismo de defensa contra patógenos

La autofagia cumple un papel destacado en la defensa celular contra patógenos invasores, ya que mediante este proceso las células pueden eliminar distintos patógenos y controlar su replicación intracelular (Levine and Deretic 2007; Jia et al. 2009; Yuk et al. 2012). En particular, al proceso de degradación de patógenos intracelulares como virus, parásitos y bacterias mediante autofagia se le conoce como “xenofagia”. En el caso de la autofagia antibacteriana, los autofagosomas pueden capturar tanto bacterias que están libres en el citosol como bacterias que residen dentro de compartimentos membranosos como la VCS (Levine and Deretic 2007).

Se han reportado numerosos estudios donde se demuestra que al infectar células epiteliales y macrófagos con bacterias como *S. Typhimurium*, estreptococos del grupo A, *Shigella flexneri*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Toxoplasma gondii*, se genera un aumento en la respuesta autofágica de las células (Gutiérrez et al. 2004; Orvedahl and Levine 2009). Incluso, se ha reportado que *D. discoideum* utiliza la autofagia como mecanismo de defensa contra *S. Typhimurium* (Deretic et al. 2013; Virgin and Levine 2009).

Con respecto a los mecanismos moleculares asociados a este proceso, se ha reportado que un grupo de adaptadores de autofagia conocidos como SLRs (secuestroma 1 o receptores tipo p62) permiten eliminar microorganismos intracelulares por medio de la autofagia, contribuyendo en el control de patógenos intracelulares como *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Listeria* y *Shigella* (Deretic 2012). Los SLRs reconocen marcadores moleculares (como la ubiquitina, galectina y fosfolípidos de membrana modificados) presentes en los microorganismos invasores o en membranas dañadas de la célula hospedera que están asociados con el patógeno y que reclutan físicamente la maquinaria autofágica (Dupont et al. 2009; Shahnazari et al. 2010; Thurston et al. 2009; Thurston et al. 2012; Wild et al. 2011).

Como mecanismo de defensa antibacteriana, la autofagia puede actuar contra *Salmonella* de dos maneras. Mientras que la mayoría de las bacterias están contenidas dentro de la VCS, una pequeña población de *Salmonella* se escapa de esta vacuola y puede proliferar activamente en el citosol. Estas bacterias citosólicas no pasan desapercibidas, y son marcadas con ubiquitina poco después de su liberación de la VCS. La ubiquitinación conduce al reclutamiento de una variedad de adaptadores de autofagia que incluyen p62, NDP52 y optineurina (OPTN) (Mostowy 2013), que se unen a las bacterias ubiquitinadas a través de un dominio de ubiquitina (Ub) y vincula a los autofagosomas a través de su interacción con LC3. Una vez que las bacterias son contenidas en un autofagosoma, éstas son eliminadas en el ambiente hidrolítico producido por la fusión del autofagosoma con el lisosoma (Mostowy 2013). La segunda forma en que *Salmonella* es eliminada por la autofagia consiste en el reconocimiento de una VCS dañada por la actividad del SST3_{SPI-1}.

En este caso, *Salmonella* no necesita estar libre en el citosol para que ocurra la captura y degradación autofágica (Birmingham et al. 2006). La perforación de la membrana de la VCS por el SST3^{SPI-1} conduce al reclutamiento de galectinas citosólicas, incluida la galectina-8, que sirven como monitores de la integridad del endolisosoma (Thurston et al. 2009; Wild et al. 2011; Zheng et al. 2009). La VCS marcada con galectina-8 recluta a la ubiquitina ligasa y a NDP52 en la membrana, marcando así estos compartimentos para la eliminación autofágica. Por su parte, los receptor de la autofagia NDP52 y TAX1BP1 también se unen a distintos compartimentos en células infectadas con *Salmonella*, lo que es requerido para la activación de la autofagia y la eliminación de esta bacteria patógena (Cemma et al. 2011; Tumbarello et al. 2015).

8.7. Efectores de *Salmonella* que modularían la autofagia en la célula hospedera

Notablemente, los patógenos intracelulares han desarrollado herramientas durante la evolución para tomar control de etapas específicas de distintos procesos fisiológicos con el fin de sobrevivir y replicarse dentro de la célula hospedera. Algunos de estos factores podrían modular el proceso de autofagia de la célula hospedera. Por ejemplo, el factor de virulencia SopB es una proteína efectora secretada por el SST3^{SPI-1} de *S. Typhimurium* que es ubiquitinada poco después de ser secretada en células embrionarias de ratón (MEF), señal que es reconocida por la célula hospedera para su entrega a compartimentos vesiculares internos y su posterior eliminación (Ruan et al. 2014). Además, uno de los principales blancos de SopB en células mamíferas es AKT, una serina/treonina quinasa que tanto en mamíferos como en *Dictyostelium* cumple un rol importante en funciones como supervivencia celular, inducción del anabolismo e

inhibición indirecta de la autofagia, regulando positivamente a TORC1 (Bhaskar and Hay 2007; Cooper et al. 2011; Furse et al. 2015; Meili et al. 2000). Otras bacterias patógenas como *Mycobacterium* y *Listeria* también tienen como blanco a AKT en células epiteliales, sugiriendo que la modulación de la actividad de esta proteína quinasa es importante para establecer la infección (Mansell et al. 2001; Yang et al. 2018). SopB es un factor de virulencia con actividad fosfatidil inositol fosfatasa, actividad necesaria para aumentar en la membrana celular los niveles de PI(3,4)P₂ y PI(3,4,5)P₃ en desmedro de PI(4,5)P₂ (Mallo et al. 2008). Por otra parte, el dominio PH de la proteína AKT se une con alta afinidad a fosfoinosítidos que presentan grupos fosfato en posición 3' del grupo inositol, como PI(3,4)P₂ y PI(3,4,5)P₃ (Cooper et al. 2011; Furse et al. 2015). Esto concuerda con observaciones que sugieren que SopB de *S. Typhimurium* puede activar la proteína AKT en células HeLa (Cooper et al. 2011; Furse et al. 2015; Roppenser et al. 2013). Finalmente, SopB también puede reclutar hacia la VCS a la proteína Vps34, una PI3K de tipo 3 de la célula hospedera que participa en la iniciación de la autofagia. Esto lo hace a través de Rab5, con la finalidad de mantener y reparar la VCS (Mallo et al. 2008). En conjunto, estos antecedentes sugieren fuertemente que el efector SopB de *S. Typhimurium* es capaz de tomar control del proceso de autofagia de la célula hospedera.

Por otro lado, el factor de virulencia SptP de *S. Typhimurium* es una proteína efectora secretada por el SST3_{SPI-1} que presenta dos dominios funcionales. El dominio GAP en el N-terminal actúa durante la entrada del patógeno a la célula hospedera mediante la inactivación de Cdc42. Esto genera cambios en el ordenamiento del citoesqueleto de actina de la célula hospedera que facilitan la internalización de la bacteria (Fu and Galan 1998). Por su parte, el dominio C-terminal de SptP presenta actividad tirosina fosfatasa,

del cual se ha reportado que funciona tardíamente en el proceso de entrada del patógeno, cuando se encuentra dentro de endosomas (Humphreys et al. 2009). También se ha demostrado que SptP de *S. Typhimurium* puede inactivar la vía MAPK en células epiteliales HeLa y Henle 407, mientras que YopH de *Yersinia enterocolitica*, una proteína homóloga a SptP, puede inactivar la proteína AKT en la línea de macrófagos murinos J774-A1 (Murli et al. 2001; Sauvonnet et al. 2002). Considerando que tanto la vía de las MAPK como la vía PI3K-AKT regulan directa o indirectamente el inicio de la autofagia, es razonable pensar que el efector SptP de *S. Typhimurium* podría tomar control de la autofagia durante la infección.

Finalmente, *S. Typhimurium* tiene una proteína no caracterizada llamada PphB que se encuentra codificada en un gen localizado en la vecindad de la SPI-1. PphB es una serina/treonina fosfatasa hipotética que presenta un 40% de identidad aminoacídica con la proteína fosfatasa de tipo 2 Humana (PP2A). Datos reportados con la proteína PP2A humana han demostrado que esta fosfatasa participa en la modulación de procesos biológicos mediante la activación de MAPK. Esto lo hace manteniendo desfosforilado el residuo S259, previniendo la formación del complejo inactivo Raf-1/14-3-3 (Abraham et al. 2000).

En conjunto, los antecedentes presentados destacan la relevancia de las proteínas SopB, SptP y PphB durante la infección de *S. Typhimurium*. Además, sugieren que esta bacteria ha desarrollado distintos mecanismos de subversión de la célula hospedera para modular la autofagia con el fin de asegurar su supervivencia intracelular.

8.8. Propuesta de investigación

A pesar que *Salmonella* pasa una parte importante de su ciclo de vida interactuando con amebas, no se han realizado estudios con la finalidad de comprender los mecanismos moleculares utilizados por este patógeno para sobrevivir dentro de dichos organismos. Cabe mencionar que este tipo de estudios permite obtener conocimientos sobre la evolución de la propia patogenicidad de *Salmonella*, ya que esta bacteria probablemente adquirió la capacidad de sobrevivir dentro de las células eucariontes a partir de su interacción con protozoos ambientales, como las amebas. De esta forma, surge el interés de determinar si proteínas de tipo fosfatidil inositol fosfatasa, tirosina fosfatasa y serina/treonina fosfatasa como SopB, SptP y PphB respectivamente, cumplen algún rol en la modulación del proceso de autofagia en macrófagos murinos y en la ameba *D. discoideum*. El análisis de los resultados referentes a alteraciones de la autofagia y su relación con cambios en la supervivencia intracelular de *Salmonella* en macrófagos y *D. discoideum* también podrían explicar distintos aspectos de la relación de esta bacteria con otras células hospederas de mamíferos.

9. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

9.1 Hipótesis

A partir de los antecedentes presentados, se propone la siguiente hipótesis de trabajo:

“Los factores de virulencia SopB, SptP y PphB modulan el proceso de autofagia, favoreciendo la supervivencia intracelular de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en la ameba *Dictyostelium discoideum* y en macrófagos murinos”.

9.2 Objetivo general

Determinar si los factores de virulencia SopB, SptP y PphB modulan el proceso de autofagia contribuyendo en la supervivencia intracelular de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en la ameba *Dictyostelium discoideum* y en macrófagos murinos.

9.3 Objetivos específicos

1. Determinar si los factores de virulencia SopB, SptP y PphB de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium contribuyen a la supervivencia intracelular del patógeno en la ameba *Dictyostelium discoideum*.
2. Determinar si los factores de virulencia SopB, SptP y PphB de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium contribuyen a la supervivencia intracelular del patógeno en macrófagos murinos.
3. Determinar si los factores de virulencia SopB, SptP y PphB de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium modulan el proceso de autofagia en la ameba *Dictyostelium discoideum*.
4. Determinar si los factores de virulencia SopB, SptP y PphB de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium modulan el proceso de autofagia en macrófagos murinos.

10. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1 Reactivos

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

De **Bio-Rad, Inc (CA, USA)**, se obtuvo: solución 40% acrilamida/bis-acrilamida, leche en polvo sin grasa para bloqueo de membranas (*western blot*).

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

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

De **Cell Signaling Technology, Inc (MA, USA)**, se obtuvo: anticuerpo primario *rabbit* anti-pAKT(T308) (#9275), anticuerpo primario *mouse* anti-ERK1/2 (#9107), anticuerpo primario *rabbit* anti-pERK1/2(T202 y Y204) (#4376), anticuerpo primario *rabbit* anti-mTOR (#2972), anticuerpo primario *rabbit* anti-pmTOR(S2448) (#2971), anticuerpo secundario *mouse* anti-IgG conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (#7076), anticuerpo secundario *rabbit* anti-IgG conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (#7074).

De **Corning, Inc (NY, USA)**, se obtuvo: *buffer* fosfato salino (PBS) 1x, suero fetal bovino (SFB).

De **Formedium, Ltd (United Kingdom)**, se obtuvo: medio HL5 suplementado con vitaminas y microelementos.

De **Gibco (NY, USA)**, se obtuvo: azul de tripán, *Dulbecco's Modified Eagle Medium* 1x (DMEM).

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

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

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

De **Merck (NJ, USA)**, se obtuvo: cloruro de sodio, sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), ácido cítrico monohidratado, acetato de sodio, glucosa, cloruro de potasio, cloruro de magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), glicerol, ácido clorhídrico fumante, isopropanol, ácido acético glacial, hidróxido de sodio, etanol absoluto, fosfato dipotásico trihidratado ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), fosfato monopotásico (KH_2PO_4), sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), sulfato de potasio (K_2SO_4), fosfato disódico (Na_2HPO_4), metanol, peptona, extracto de levadura, *buffer* TAE 50x, membranas de PVDF Inmovilion-P, Triton X-100, filtros Millipore con poros de 0,22 μm de diámetro, inhibidor de proteasas “*Mini-cOmplete EDTA-free*” y el inhibidor de fosfo proteasas “*PhosSTOP*”.

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

De **Promega (WI, USA)**, se obtuvo: desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) para PCR.

De **Qiagen (CA, USA)**, se obtuvo: 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 **Santa Cruz Biotechnology, Inc (TX, USA)**, se obtuvo: anticuerpo primario *mouse* anti-AKT (sc-81434), anticuerpo primario *mouse* anti-GAPDH (sc-365062).

De **Sigma Chemical Co. (MO, USA)**, se obtuvo: kanamicina, ampicilina, gentamicina, estreptomicina, L-arabinosa, azul de bromofenol, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), β -mercaptoetanol y sistema comercial para extracción de DNA genómico “*GenElute Bacterial Genomic DNA Kit*”.

De **Thermo Fisher Scientific (MA, USA)**, se obtuvo: solución antibiótica/antimicótica 100x, estándar de proteínas “*PageRuler*”, reactivo “*Supersignal West-Femto*”, reactivo de extracción de proteínas “*T-PER*” y sistemas comerciales para clonamiento “*pBAD TOPO TA Expression Kit*”.

De US Biological (Swampscott, MA, USA), se obtuvo: dodecil sulfato de sodio (SDS) y Tris base.

10.2 Cepas bacterianas

Todas las cepas bacterianas utilizadas en esta tesis se presentan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Cepas bacterianas usadas en esta tesis.

Cepas	Característica / Genotipo	Origen / Referencia
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium		
WT	Cepa silvestre 14028s	Colección del laboratorio
$\Delta sopB$	14028s $\Delta sopB::Kan$	Esta tesis
$\Delta sptP$	14028s $\Delta sptP::Kan$	Esta tesis
$\Delta pphB$	14028s $\Delta pphB::Kan$	Esta tesis
$\Delta phoN$	14028s $\Delta phoN::Cat$	Colección del laboratorio
$\Delta araA$	14028s $\Delta araA::kan$	Colección del laboratorio
WT / pBAD	14028s transformada con el plasmidio pBAD-TOPO	Esta tesis
$\Delta sopB$ / $\psi sopB$	14028s $\Delta sopB::Kan$ transformada con el plasmidio pBAD-TOPO:: $sopB$	Esta tesis
$\Delta sptP$ / $\psi sptP$	14028s $\Delta sptP::Kan$ transformada con el plasmidio pBAD-TOPO:: $sptP$	Esta tesis
$\Delta pphB$ / $\psi pphB$	14028s $\Delta pphB::Kan$ transformada con el plasmidio pBAD-TOPO:: $pphB$	Esta tesis
$\Delta sopB$ / pFCcGi	14028s $\Delta sopB::Kan$ transformada con el plasmidio pFCcGi	Esta tesis
$\Delta sptP$ / pFCcGi	14028s $\Delta sptP::Kan$ transformada con el plasmidio pFCcGi	Esta tesis
$\Delta pphB$ / pFCcGi	14028s $\Delta pphB::Kan$ transformada con el plasmidio pFCcGi	Esta tesis
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA relA1 del(lac-argF)U169 deoR phi80 del(lac)M15</i>	Colección del laboratorio
DH5 α /pKD46	<i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA relA1 del(lac-argF)U169 deoR phi80 del(lac)M15/pKD46</i>	Colección del laboratorio
DH5 α λ pir/pCLF4	<i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA relA1 del(lac-argF)U169 deoR phi80 del(lac)M15 λ pir/pCLF4</i>	Colección del laboratorio
<i>Klebsiella aerogenes</i>		
DBS0305928	Cepa silvestre	<i>Dicty Stock Center</i> (DictyBase)

10.3 Líneas celulares

Las distintas líneas celulares usadas en esta tesis se presentan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Líneas celulares usadas en esta tesis.

Cepas	Característica / Genotipo	Origen / Referencia
Macrófagos		
RAW264.7	Línea de macrófagos murinos adherentes establecida desde un tumor inducido por el Virus de la Leucemia Murina de Abelson en un ratón BALB/c	European Collection of Cell Cultures (ECACC)
RAW264.7 EGFP-LC3	Línea de macrófagos transfectada con el plasmidio pEGFP-LC3, que permite la expresión constitutiva del marcador de autofagia LC3 fusionado a GFP	Esta tesis
Amebas		
<i>D. discoideum</i> AX4	Cepa silvestre axénica (DictyBase ID DBS0302402)	(Knecht et al. 1986)
<i>D. discoideum</i> GFP-LC3	Cepa AX4 transformada con el plasmidio pTX, que permite la expresión constitutiva del marcador de autofagia LC3 fusionado a GFP	Dr. Ricardo Escalante (Mesquita et al. 2013).

10.4 Plasmidios

Los distintos plasmidios usados en esta tesis se presentan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Plasmidios usados en esta tesis.

Plasmidio	Descripción	Origen / Referencia
pKD46	<i>bla</i> PBAD <i>gam</i> <i>bet</i> <i>exo</i> oriRpSC101(TS), Amp ^R (GenBank AY048746)	(Datsenko and Wanner 2000)
pCLF4	<i>bla</i> FRT <i>aph</i> FRT P1 P2 oriR6K, promotor T7, Amp ^R , Kan ^R (GenBank EU629214)	(Santiviago et al. 2009)
pBAD-TOPO	Vector comercial de expresión, Amp ^R	Thermo Fisher Scientific
<i>psopB</i>	Vector pBAD-TOPO con el gen silvestre <i>sopB</i> de <i>S. Typhimurium</i> 14028s clonado, Amp ^R	Esta tesis
<i>psptP</i>	Vector pBAD-TOPO con el gen silvestre <i>sptP</i> de <i>S. Typhimurium</i> 14028s clonado, Amp ^R	Esta tesis
<i>ppphB</i>	Vector pBAD-TOPO con el gen silvestre <i>pphB</i> de <i>S. Typhimurium</i> 14028s clonado, Amp ^R	Esta tesis
pFCcGi	Vector que contiene clonado el gen EGFP bajo el control del promotor PBAD (inducible) y el gen mCherry bajo el control del promotor de <i>rpsM</i> (constitutivo), Amp ^R	Figueira et al., 2013
pGFP-LC3	Vector que expresa de forma constitutiva el marcador de autofagia LC3 fusionado a GFP	Ricardo Escalante Lab (Mesquita et al. 2013).
pEGFP-LC3	Vector que expresa de forma constitutiva el marcador de autofagia LC3 fusionado a EGFP	(Lee et al. 2008)

10.5 Partidores

Los distintos partidores usados en esta tesis se presentan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Partidores usados en esta tesis.

Partidores	Secuencia 5' - 3'
<i>sopB</i> _H1+P1	TAAAAACGCTATGCAAATACAGAGCTTCTATCACTCAGCT GTGCAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>sopB</i> _H2+P2	ACCTCAAGACTCAAGATGTGATTAATGAAGAAATGCCTT CATATGAATATCCTCCTTAG
<i>sopB</i> _Out5	AGAGACAAAAGCGGCAAAAA
<i>sopB</i> _Out3	GGCATAAAGGGACAGCACAT
<i>sptP</i> _H1+P1	CTGCAGGAATATGCTAAAGTATGAGGAGAGAAAATTGAAT GTGCAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>sptP</i> _H2+P2	TATGTTTTTATCAGCTTGCCGTCGTCATAAGCAACTGGG CATATGAATATCCTCCTTAG
<i>sptP</i> _Out5	TGATATGTGTTCCGATGCGT
<i>sptP</i> _Out3	GGAATGTCAGCAGAAGAGAAAA
<i>pphB</i> _H1+P1	TAGGAACATCATGGAATTAATTCGTTATGCTGACATCAAC GTGCAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>pphB</i> _H2+P2	TATTTCCAGATTACTTTATTTTAAAAAAGACAGATTGCC CATATGAATATCCTCCTTAG
<i>pphB</i> _Out5	TCAATAAAGTGTTCGCGAG
<i>pphB</i> _Out3	GCTGAAATGGGCAGAAAAAC
pBAD_Fw	ATGCCATAGCATTTTTATCC
pBAD_Rv	GATTTAATCTGTATCAGG

Las secuencias en negrita hibridan en regiones que flanquean el *cassette* de resistencia a antibiótico del vector pCLF4.

10.6 Medios y condiciones de cultivo bacterianos

Las bacterias se cultivaron rutinariamente a 37°C (o a 30°C cuando contenían plasmidios termosensibles) con agitación en medio Luria-Bertani (LB; 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl). Cuando se requirió, el medio LB se suplementó con kanamicina (Kan, 75 µg/mL) o ampicilina (Amp, 100 µg/mL) para seleccionar y/o propagar bacterias transformantes o mutantes. Para los cultivos en medio sólido, el medio LB se suplementó con Bacto-Agar (15 g/L) como gelificante. En general, los inóculos bacterianos para los ensayos de infección en *D. discoideum* y macrófagos RAW264.7 se

prepararon en medio LB (y medio LB suplementado con Amp en el caso de cepas complementadas con plasmidios) y se incubaron durante al menos 12 h sin agitación a 37°C.

10.7 Medios y condiciones de cultivo celular

10.7.1 *Dictyostelium discoideum* AX4

Las amebas se cultivaron inicialmente a 22°C sobre un césped de *Klebsiella aerogenes* DBS0305928 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 MgSO₄·7H₂O; 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 10 min. Posteriormente, las amebas obtenidas a partir de las placas de fagocitosis generadas en el césped bacteriano crecido en el agar SM se cultivaron con agitación a 22°C en medio líquido HL5 (14 g/L de triptona; 7 g/L de extracto de levadura; 14 g/L de glucosa; 0,35 g/L de Na₂HPO₄; 1,2 g/L de KH₂PO₄, pH 6,3) suplementado con estreptomicina (Str, 300 µg/mL) y Amp (100 µg/mL). A partir del primer subcultivo, las amebas se cultivaron en medio HL5 suplementado sólo con Amp para finalmente obtener un cultivo axénico a partir del tercer subcultivo. La concentración celular de los subcultivos se controló mediante tinción con azul de tripán y posterior recuento en cámara de Neubauer. Los subcultivos siempre se realizaron con células en fase de crecimiento exponencial temprana (~1 - 2 x 10⁶ células/mL). En los ensayos de infección siempre se utilizaron amebas provenientes de entre el tercer y el sexto subcultivo.

10.7.2 *Dictyostelium discoideum* AX4 GFP-LC3

Las amebas correspondientes a la cepa que expresa la proteína fluorescente verde fusionada con el marcador autofágico LC3 (GFP-LC3) se cultivaron inicialmente a 22°C sobre un césped de *K. aerogenes* DBS0305928 crecido en placas de agar SM, esta vez sin tratar las bacterias con luz UV. Posteriormente, las amebas obtenidas a partir de las placas de fagocitosis generadas en el césped bacteriano crecido en el agar SM se cultivaron adheridas en placas Petri, sin agitación a 22°C en medio líquido HL5 comercial (Formedium), suplementando con una solución antibiótica/antimicótica 100x (Thermo Fisher Scientific) por 1 día, para posteriormente suplementar los cultivos con G418 (10 µg/mL). El control de la adherencia y concentración celular se realizó de manera visual, observando las placas Petri al microscopio óptico, procurando subcultivar cuando se alcanzó una confluencia celular cercana al 80%. Los correspondientes subcultivos se realizaron de la misma manera descrita para la cepa silvestre. Una vez alcanzada una confluencia celular cercana al 80%, se resuspendieron las amebas con el fin de estimar su concentración mediante tinción con azul de tripán y posterior recuento en cámara de Neubauer.

10.7.3 Macrófagos RAW264.7

Los macrófagos se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de SFB a 37°C con 5% de CO₂, manteniendo los cultivos hasta una confluencia celular del 80% y haciendo subcultivos lavando con PBS 1x y suspendiendo las células adheridas utilizando una solución de PBS con Tripsina-EDTA 1x. Posteriormente, la suspensión de células se

centrifugó a 300 x g y se resuspendió en 1 mL de medio DMEM para volver a cultivar 200µL de esta suspensión en 10 mL de medio DMEM. Para los ensayos de infección, la concentración celular de los cultivos se controló mediante tinción con azul de tripán y posterior recuento en cámara de Neubauer.

10.7.4 Macrófagos RAW264.7 EGFP-LC3

Los macrófagos RAW264.7 EGFP-LC3 corresponden a una línea transiente, donde hubo que transfectar los macrófagos cada vez que se requirieron utilizar. Para esto, se tripsinizaron los macrófagos obtenidos desde un cultivo en medio DMEM suplementado con 10% de SFB a 37°C con 5% de CO₂ para obtener una suspensión celular titulada mediante tinción con azul de tripán y recuento en cámara de Neubauer. Posteriormente, se sembraron ~2 x 10⁵ células/pocillo en una placa *µ-Slide* de 8 pocillos (Ibidi GmbH). Al día siguiente, se retiró el medio de cultivo y se agregaron 400 µL de Opti-MEM, un medio de cultivo ideal para transfecciones con lípidos catiónicos como Lipofectamina o TransIt-LT1. En paralelo, se prepararon las siguientes mezclas:

Mezcla	Opti-MEM	pEGFP-LC3	TransIT-LT1
1	50 µL	800 ng/pocillo	
2	50 µL		1,5 µL/pocillo

Las mezclas 1 y 2 se incubaron por 5 min a temperatura ambiente, para luego juntarlas y generar la mezcla de transfección, la cual se incubó por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó 100 µL de la mezcla de transfección a cada pocillo con células en Opti-MEM y se incubó por 16 h a 37°C con 5% de CO₂. Finalmente, se

retiró el Opti-MEM y las células se incubaron en medio DMEM suplementado con 10% de SFB a 37°C con 5% de CO₂ por 2 h para restablecer los niveles de autofagia basales antes de realizar los ensayos de infección.

10.8 Extracción de DNA genómico

El DNA genómico de las distintas cepas derivadas de *S. Typhimurium* 14028s (**Tabla 1**) se extrajo empleando el sistema comercial “*GenElute Bacterial Genomic DNA Kit*” (Sigma) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las cepas se cultivaron en medio LB a 37°C con agitación durante al menos 16 h. La elución final del DNA se hizo en 100 µL de H₂O libre de nucleasas y luego se almacenó a -20°C hasta su uso.

10.9 Extracción de DNA plasmidial

Los distintos plasmidios utilizados en esta tesis (**Tabla 3**) se extrajeron desde sus respectivas cepas portadoras (**Tabla 1**) usando el sistema comercial “*QIAprep Spin Miniprep Kit*” (Qiagen) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Para ello, las cepas se cultivaron en medio LB suplementado con Amp (100 µg/mL) o Kan (75 µg/mL) según el marcador de selección del plasmidio y fueron incubadas durante al menos 16 h con agitación a 37°C (o a 30°C en el caso de los plasmidios termosensibles como pKD46). En la etapa final de la extracción, el DNA plasmidial se eluyó en 50 µL de H₂O libre de nucleasas y luego se almacenó a 4°C hasta su uso.

10.10 Construcción de cepas mutantes de *S. Typhimurium* con delección de genes específicos mediante el método *Red-swap*

10.10.1 Obtención de productos de PCR para la generación de las cepas mutantes

Las cepas *S. Typhimurium* $\Delta sopB$, $\Delta sptP$ y $\Delta pphB$ (**Figura 5** y **Tabla 1**), fueron construidas utilizando el método de intercambio alélico por recombinación de productos de PCR mediado por la recombinasa Red del fago λ (Datsenko and Wanner 2000), con modificaciones (Santiviago et al. 2009). Para generar estas cepas mutantes, se diseñaron partidores (**Tabla 4**) que tienen 60 nucleótidos de largo total, cuyos extremos 5' contienen 40 nucleótidos idénticos a las regiones que flanquean el gen blanco a mutar, mientras que los extremos 3' de los partidores contienen 20 nucleótidos que hibridan con los extremos 5' o 3' de un *cassette* de resistencia a antibiótico flanqueado por sitios FRT (*Flp recombinase target sequence*) presente en el plasmidio pCLF4 (Kan^R, GenBank EU629214, **Tabla 3**). Los *cassettes* de resistencia a antibiótico fueron amplificados mediante PCR usando los partidores correspondientes bajo las siguientes condiciones de reacción y amplificación:

Reactivo	Reacción para PCR		Programa de amplificación		
	Volumen (μ L)	Concentración final	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo	Ciclos
H ₂ O	30,5	-	98	30 s	1
Partidos H1+P1 (10 μ M)	5	1 μ M	98	30 s	
Partidos H2+P2 (10 μ M)	5	1 μ M	60	30 s	30
dNTPs (10 mM cada uno)	1	0,2 mM	72	2 min	
MgCl ₂ (50 mM)	2	2 mM	72	5 min	1
pDNA (pCLF4, 100 ng/ μ L)	1	2 ng/ μ L	10	∞	-
<i>Buffer</i> PCR (10x)	5	1x			
<i>Taq</i> DNA polimerasa (5 U/ μ L)	0,5	2,5 U			
Volumen final	50				

10.10.2 Preparación de bacterias electrocompetentes y transformación bacteriana

Para obtener bacterias electrocompetentes, se cultivó *S. Typhimurium* 14028s en medio LB a 37°C con agitación durante toda la noche. A partir de este cultivo, se realizó una dilución 1:100 en 20 mL del mismo medio y se cultivó a 37°C con agitación hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0,4 - 0,6. Luego, las bacterias se centrifugaron a 9.200 x g durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se descartó y el sedimento obtenido se resuspendió en 20 mL de H₂O miliQ estéril y fría. La suspensión bacteriana se centrifugó nuevamente, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 20 mL de H₂O miliQ estéril y fría. Este proceso de centrifugación y lavados se repitió 3 veces. Finalmente, el sedimento se resuspendió en ~100 µL de H₂O miliQ estéril y fría.

S. Typhimurium 14028s se transformó con el plasmidio pKD46 (**Tabla 3**) por electroporación mediante la aplicación de un pulso de 1.8 KV (usando un electroporador “*E. coli* Pulser” Bio-Rad) sobre una mezcla de 80 µL de la suspensión de bacterias electrocompetentes y 1 µL del plasmidio purificado (20 ng), la cual previamente se había incubado en hielo por 5 min. pKD46 es un plasmidio termosensible que tiene clonado los genes que codifican las subunidades de la recombinasa Red del fago λ bajo el control de un promotor inducible por arabinosa (*ParaBAD*), y que además otorga resistencia a Amp como marcador de selección (Datsenko and Wanner 2000). Inmediatamente después de la electroporación, la suspensión de bacterias se recuperó agregando 1 mL de medio LB fresco e incubando a 30°C con agitación durante 1 h. Por último, las bacterias se sembraron sobre agar LB suplementado con Amp (100 µg/mL) y se incubaron a 30°C toda la noche para seleccionar colonias transformantes.

10.10.3 Mutagénesis por recombinación de productos de PCR

Se cultivó la cepa *S. Typhimurium* 14028s transformada con el plasmidio pKD46 en medio LB suplementado con Amp (100 µg/mL) y glucosa al 0,2% a 30°C durante toda la noche. Al día siguiente, las bacterias se subcultivaron a razón 1:100 en 20 mL de medio LB fresco suplementado con Amp y se incubaron con agitación a la misma temperatura hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0,4. En ese momento, el medio se suplementó con L-arabinosa a una concentración final de 10 mM para inducir la expresión del sistema de recombinación Red codificado en el plasmidio pKD46. Después de 1 h de incubación a 30°C con agitación, se prepararon bacterias electrocompetentes como se describió anteriormente (**ver sección 10.10.2**).

Un volumen de 80 µL de la suspensión de bacterias electrocompetentes se mezcló con 5 µL de producto PCR purificado obtenido a partir del plasmidio pCLF4 (**ver sección 10.10.1**). La mezcla se incubó durante 5 min en hielo y luego se realizó la transformación por electroporación mediante la aplicación de un pulso de 1.8 KV usando un electroporador “*E. coli* Pulser” Bio-Rad. Las bacterias se recuperaron inmediatamente después de la electroporación en 1 mL de medio LB fresco, incubado a 37°C (temperatura restrictiva para la replicación del plasmidio pKD46) con agitación durante 1 h. Las colonias mutantes se seleccionaron sembrando en agar LB suplementado con Kan (75 µg/mL) e incubado a 37°C durante toda la noche.

10.10.4 Comprobación de las colonias mutantes mediante PCR

La correcta construcción de todas las mutantes derivadas de *S. Typhimurium* 14028s se verificó mediante PCR de colonias utilizando partidores específicos para cada mutante a obtener (**Tabla 4**). Se usaron partidores “Out” que hibridan en regiones externas, río arriba y río abajo de cada gen para verificar la correcta inserción del *cassette* de resistencia a antibiótico en el cromosoma por recombinación homóloga durante la mutagénesis. Como DNA molde, se usó el sobrenadante de una suspensión de las distintas colonias mutantes en 50 μ L de H₂O libre de nucleasas y estéril, calentada a 100°C durante 5 min, y centrifugada a 9.200 x g por 5 min. La reacción de PCR y amplificación se realizó según el siguiente protocolo:

Reactivo	Reacción para PCR		Programa de amplificación		
	Volumen (μ L)	Concentración final	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
H ₂ O	6,2	-	98	2 min	1
Partidor Out5 (10 μ M)	1,5	1 μ M	98	30 s	
Partidor Out3 (10 μ M)	1,5	1 μ M	60	30 s	30
dNTPs (10 mM cada uno)	1	0,2 mM	72	2 min	
MgCl ₂ (50 mM)	2	2 mM	72	5 min	1
gDNA (suspensión bacteriana)	1	-	10	∞	-
Buffer PCR (10x)	1,5	1x			
Taq DNA polimerasa (5 U/ μ L)	0,3	1,5 U			
Volumen final	15				

10.11 Complementación en *trans* de las mutantes $\Delta sopB$, $\Delta sptP$ y $\Delta pphB$ de *S. Typhimurium*

El fenotipo de las mutantes por delección generadas por el método *Red-swap* en *S. Typhimurium* se complementó en *trans*, utilizando el sistema comercial “*pBAD TOPO TA Expression Kit*” (Thermo Fisher Scientific), que consta del vector de expresión pBAD-TOPO (**Tabla 3**) en el cual se clonó una copia silvestre de *sopB*, *sptP* o *pphB* para ser reincorporado en su respectiva cepa mutante.

La copia silvestre de cada gen se amplificó mediante PCR usando el mismo protocolo de amplificación utilizado para la comprobación de las cepas mutantes descrito en la **sección 10.10.4**, pero en este caso el molde correspondió a DNA genómico purificado desde *S. Typhimurium* 14028s (**ver sección 10.8**). En la amplificación mediante PCR se usaron los partidores Out5 y Out3 (**Tabla 4**) que hibridan en sitios externos río arriba y río abajo del gen *sopB*, *sptP* o *pphB*, según corresponda, para así abarcar su región promotora. Cada fragmento amplificado se analizó mediante electroforesis, se purificó mediante el sistema comercial “*QIAquick PCR Purification Kit*” (Qiagen) y se clonó en el vector de expresión pBAD-TOPO, de acuerdo con el protocolo del fabricante. El vector pBAD-TOPO confiere resistencia a Amp y contiene un promotor inducible por arabinosa (*ParaBAD*) que precede a su zona de clonamiento.

En paralelo, se preparó bacterias electrocompetentes de la cepa *E. coli* DH5 α (**ver sección 10.10.2**), las que se transformaron con el vector pBAD-TOPO portando cada gen clonado (*psopB*, *psptP* y *ppphB*; **Tabla 3**), según las indicaciones del fabricante.

Las bacterias transformantes se seleccionaron en agar LB suplementado con Amp (100 µg/mL) a 37°C durante toda la noche. Considerando que el vector pBAD-TOPO es provisto como una molécula lineal, la reacción de ligación durante el clonamiento puede originar plasmidios en que el gen de interés se haya insertado a favor o en contra del sentido del promotor *ParaBAD*. Por esto, se determinó la orientación de cada inserto mediante PCR de colonia utilizando la pareja de partidores Out5 – pBAD_Fw (**ver sección 10.10.4 y Tabla 4**) que, dependiendo del gen a clonar, produce un amplicón de determinado tamaño sólo si está orientado a favor del promotor inducible. Algunas de las transformantes de *E. coli* DH5α que generaron una amplificación positiva en el PCR de colonia se cultivaron en medio LB suplementado con Amp a 37°C durante toda la noche para la extracción de cada plasmidio recombinante portando el correspondiente gen de interés (**ver sección 10.9**).

Para la complementación en *trans* de las cepas $\Delta sopB$, $\Delta sptP$ y $\Delta pphB$ de *S. Typhimurium*, cada mutante se transformó mediante electroporación (**ver sección 10.10.2**) con el plasmidio recombinante que portaba el respectivo gen a complementar. Las mutantes transformadas con su respectivo plasmidio se seleccionaron sembrando en agar LB suplementando con Amp e incubando a 37°C durante toda la noche. Adicionalmente, la cepa silvestre *S. Typhimurium* se transformó con el vector pBAD-TOPO vacío para usarla como control de complementación.

10.12 Ensayos de infección en líneas celulares

10.12.1 Ensayos de infección en macrófagos murinos RAW264.7

Para realizar estos ensayos, la botella de cultivo de células se lavó 3 veces con 10 mL de PBS estéril a temperatura ambiente, se agregó 1 mL de tripsina-EDTA 1x más 9 mL de PBS y se incubó a 37°C por 10 min. Las células en suspensión fueron sedimentadas para luego ser resuspendidas en 1 mL de DMEM suplementado con 10% SFB y fueron tituladas mediante tinción con azul de tripán y recuento en cámara de Neubauer. Posteriormente, se sembró $\sim 5 \times 10^4$ células/pocillo en placas Elisa de 96 pocillos y se incubó a 37°C con 5% en CO₂ por 24 h para que las células formaran una monocapa en el pocillo.

Por otro lado, las distintas cepas bacterianas fueron crecidas en medio LB durante toda la noche y después fueron llevadas hasta una OD_{600nm} = 0,2 con medio LB, se lavaron 3 veces en PBS y fueron diluidas 5 veces en medio DMEM suplementado con 10% SFB. Posteriormente, se determinó el número exacto de bacterias en esta suspensión (UFC agregadas) mediante dilución seriada y siembra en agar LB. Se infectó cada pocillo de células con 100 µL de las suspensiones bacterianas para obtener una multiplicidad de infección (MOI) de ~ 100 bacterias/célula y se incubó por 1 h a 37°C con 5% de CO₂. Inmediatamente después de la incubación, las células se lavaron dos veces con PBS estéril y a cada pocillo se le agregó 100 µL de DMEM suplementado con 10% SFB y gentamicina (200 µg/L) y fueron incubadas por 45 min para eliminar las bacterias extracelulares (tiempo 0). Luego, se removió todo el medio de cultivo, se lavó las células dos veces con

PBS estéril, se agregó 100 µL de DMEM suplementado con 10% SFB y gentamicina (20 µg/mL) y se incubaron por 1, 3 y 5 h post infección.

Las células fueron lisadas utilizando Triton-X100 0,2% en PBS y se determinó el número de bacterias recuperadas (UFC a t1, t3 y t5) mediante dilución seriada y siembra en agar LB. Los resultados del ensayo fueron expresados como:

$$\% \text{ de Internalización} = 100 \times (\text{UFC}_{t=0}) / (\text{UFC}_{\text{inoculadas}})$$

$$\text{Supervivencia relativa} = (\text{UFC}_{t=x}) / (\text{UFC}_{t=0})$$

10.12.2 Ensayos de infección en *Dictyostelium discoideum*

En esta tesis se desarrolló un nuevo ensayo de infección en *Dictyostelium discoideum* basado en determinación de UFC intracelulares (**Figura 6**) (Urrutia et al. 2018). En primer lugar, cada cepa bacteriana a evaluar fue crecida durante toda la noche con agitación a 37°C en medio LB, para luego ser ajustada a $OD_{600nm} = 0,2$ y lavada dos veces en *buffer* Soerensen. Posteriormente, 150 µL de cada suspensión bacteriana fue diluida agregando 850 µL de *buffer* Soerensen. En paralelo, un cultivo axénico de *D. discoideum* AX4 crecido hasta fase exponencial fue lavado dos veces con *buffer* Soerensen y titulado mediante tinción con azul de tripán y posterior recuento en cámara de Neubauer. Así, una suspensión de $\sim 1 \times 10^6$ amebas/mL fue preparada usando *buffer* Soerensen. Una alícuota de 100 µL de bacterias y otra de amebas lavadas fueron mezclados en tubos Eppendorf de 1.5 mL para obtener 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. Después de la incubación, todas las mezclas fueron lavadas una vez con *buffer* Soerensen suplementado con gentamicina (10 µg/mL) para eliminar las bacterias extracelulares. Posteriormente, las amebas infectadas fueron lavadas dos veces con *buffer* Soerensen para remover el antibiotico y finalmente fueron resuspendidas en 100 µL de *buffer* Soerensen. Alícuotas de la suspensión de amebas infectadas fueron obtenidas a 0, 1, 3 y 5 h post infección. Las amebas viables fueron determinadas a cada tiempo mediante tinción con azul de tripán y posterior recuento en cámara de Neubauer. Además, las amebas infectadas recuperadas a cada tiempo fueron lavadas una vez con *buffer* Soerensen y luego lisadas con Triton X-100 al 0,2%. Los títulos de las bacterias intracelulares fueron determinados por diluciones seriadas y siembra en agar LB. Los resultados del ensayo se expresaron como:

$$\% \text{ de Internalización} = 100 \times (\text{UFC}_{t=0}) / (\text{UFC}_{\text{inoculadas}})$$

$$\text{Supervivencia relativa} = (\text{UFC}_{t=x}) / (\text{UFC}_{t=0})$$

10.13 Ensayos de infección para microscopía confocal

10.13.1 Ensayos de infección en macrófagos RAW264.7 EGFP-LC3

Macrófagos RAW264.7 que expresan la proteína fluorescente verde fusionada al marcador de autofagia LC3 (EGFP-LC3) se cultivaron de forma rutinaria (**ver sección 10.7.4**) y fueron infectadas con las distintas cepas de *S. Typhimurium* previamente

transformadas mediante electroporación con el plasmidio pFCcGi (**Tabla 3**), que expresa la proteína fluorescente roja mCherry desde un promotor constitutivo (Figueira et al. 2013).

De una suspensión de macrófagos RAW264.7 EGFP-LC3, se sembraron $\sim 2 \times 10^5$ células/pocillo en cámaras μ -Slide de 8 pocillos (Ibidi GmbH) y se permitió la adhesión de las células por 24 h a 37°C con 5% de CO₂. Posteriormente, las células fueron infectadas durante 1 h con cada cepa bacteriana a evaluar usando una MOI de ~ 500 bacterias/célula. Las células infectadas, fueron lavadas tres veces con PBS suplementado con gentamicina (200 μ g/mL) y luego lavadas con PBS para eliminar el antibiótico. Para evaluar flujo autofágico, las células fueron tratadas durante la infección (1 h) con 50 μ M de cloroquina (CQ), un conocido bloqueador de la autofagia. Las infecciones fueron visualizadas por microscopía confocal y las imágenes (Z-stacks) fueron obtenidas usando un microscopio confocal Zeiss LSM 700 equipado con un objetivo óptico de 40 \times 1.3 NA. Las imágenes fueron procesadas usando los programas Image J versión 1.50i y Fiji versión 2.2.1 (Schindelin et al. 2012; Schneider et al. 2012). La cuantificación de los autofagosomas (señal EGFP, puntos verdes) en los macrófagos infectados se realizó de forma manual.

10.13.2 Ensayos de infección en *Dictyostelium discoideum* GFP-LC3

De forma similar a la infección en macrófagos (**ver sección 10.13.1**), amebas derivadas de *D. discoideum* AX4 que expresan la proteína fluorescente verde fusionada al marcador de autofagia LC3 (GFP-LC3), se cultivó de forma rutinaria (**ver sección 10.7.2**)

y fueron infectadas con las distintas cepas de *S. Typhimurium* transformadas con el plasmidio pFCcGi (Figueira et al. 2013).

D. discoideum AX4 axénico fue sembrado $\sim 2 \times 10^5$ células/pocillo en cámaras μ -Slide de 8 pocillos (Ibidi GmbH). Después de permitir la adhesión de las amebas en los pocillos por 2 h a 22°C, las amebas fueron infectadas con cada cepa bacteriana a evaluar por 1 h a 22°C usando una MOI de ~ 500 bacterias/célula. Posteriormente, las amebas infectadas fueron lavadas una vez con *buffer* Soerensen suplementado con gentamicina (10 μ g/mL) y luego con *buffer* Soerensen para eliminar el antibiótico. Para evaluar flujo autofágico en *D. discoideum* se implementó una metodología descrita por (Cardenal-Muñoz et al. 2017). Para esto, las amebas fueron tratadas durante la infección (1 h) con una mezcla comercial de inhibidores de proteasas (IP) (Merk) a una concentración final 2x con relación a la concentración recomendada por el fabricante. Al igual que en el caso de los macrófagos, las infecciones fueron visualizadas por microscopía confocal y las imágenes (Z-stacks) fueron obtenidas usando un microscopio confocal Zeiss LSM 700 equipado con un objetivo óptico de 40x 1.3 NA. Las imágenes fueron procesadas usando los programas Image J 1.50i y Fiji 2.2.1 (Schindelin et al. 2012; Schneider et al. 2012). La cuantificación de los autofagosomas (señal GFP, puntos verdes) en las amebas infectadas se realizó de forma manual.

10.14 Ensayos de electrotransferencia de proteínas a PVDF e inmunodetección (*western blot*)

10.14.1 Preparación de extractos proteicos de macrófagos RAW264.7

Para la obtención de las proteínas totales, se realizaron ensayos de infección como está descrito anteriormente (**ver sección 10.12.1**), con modificaciones. En primer lugar, se sembraron $\sim 4 \times 10^5$ células/pocillo en placas ELISA de 12 pocillos y se infectaron los macrófagos usando una MOI de ~ 500 bacterias/célula. Posteriormente, las células sólo fueron lavadas con PBS, sin usar gentamicina. Finalmente, las células fueron lisadas agregando 70 μ L del reactivo de extracción de proteínas *T-PER* (Thermo Fisher Scientific) con inhibidores de proteasas a cada pocillo. Posteriormente la extracción de cada muestra fue centrifugada a 6.400 x g por 3 min para eliminar el debris celular y obtener las proteínas totales.

10.14.2 Preparación de extractos proteicos de *D. discoideum*

En este caso, para la obtención de las proteínas totales en *D. discoideum*, se llevaron a cabo ensayos de infección como está descrito anteriormente (**ver sección 10.12.2**) con modificaciones. Se infectó *D. discoideum* AX4 con distintas cepas de *S. Typhimurium* a un MOI de ~ 500 bacterias/ameba. Posterior a la infección, las amebas fueron lavadas con *buffer* Soerensen sin gentamicina para eliminar las bacterias. Finalmente, las amebas fueron lisadas con el reactivo de extracción de proteínas *T-PER*

con inhibidores de proteasas y posteriormente las extracciones fueron centrifugadas a 6.400 x g por 3 min para eliminar el debris celular y obtener las proteínas totales.

10.14.3 Cuantificación de proteínas

Las proteínas totales obtenidas fueron cuantificadas por espectrofotometría usando el método de Bradford. Luego de la cuantificación, las muestras fueron mezcladas con *buffer* de carga Laemmli 1x (62,5 mM Tris-HCl; pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol; 0,01% azul de bromofenol; 5% β -mercaptoetanol) para ser separadas posteriormente mediante SDS-PAGE.

10.14.4 Análisis mediante SDS-PAGE, electrotransferencia e inmunodetección

De los extractos proteicos obtenidos y cuantificados, 30 μ g de proteínas totales de cada muestra fueron separados por su masa molecular en geles de poliacrilamida al 12%, usando el sistema de electroforesis en geles *Mini-Protean III* (Bio-Rad). Las muestras se corrieron a 100 V constantes en *buffer* de corrida 1x (1,44% glicina; 0,3% Tris; 0,1% SDS).

La transferencia de las proteínas desde los geles de poliacrilamida hacia membranas de PVDF Inmovilion-P (Millipore) se realizó usando el sistema *Mini Trans-Blot* (Bio-Rad). Posterior a la activación de la membrana de PVDF mediante inmersión en metanol 100%, se llevó a cabo la transferencia durante 90 min a 300 mA en *buffer* de transferencia 1x (0,3% Tris; 1,44% glicina; 20% metanol). La membrana se

bloqueó mediante su incubación en una solución de 5% de leche para bloqueo (Bio-Rad) en *buffer* TBS-Tween (50 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20) durante 1 h a temperatura ambiente. Luego, la membrana se incubó a 4°C durante toda la noche sin agitación con el anticuerpo primario correspondiente diluido 1:1.000 (**ver sección 10.1**) en la misma solución de bloqueo. Después de 3 lavados con *buffer* TBS-Tween, la membrana se incubó con agitación a temperatura ambiente por 2 h con una solución de anticuerpo secundario anti-IgG de ratón o conejo (**ver sección 10.1**), según el anticuerpo primario, conjugado con peroxidasa de rábano a una dilución de 1:5.000 en 5% de leche para bloqueo en *buffer* TBS-Tween.

Para el revelado de las inmunodetecciones se usó el reactivo *Supersignal West-Femto* (Pierce Biotechnology, Inc), un sustrato utilizado por la enzima HRP que genera una señal quimioluminiscente. La cuantificación por pixeles de las inmunodetecciones se llevó a cabo con el programa Fiji 2.2.1 y los resultados se expresaron como el cociente entre la forma fosforilada activa versus la forma total de cada proteína (p-proteína / proteína). Las imágenes de las inmunodetecciones se obtuvieron usando el sistema de captura y análisis de imágenes *Dyversity 4* (Syngene).

10.15 Ensayo de toxicidad bacteriana

Para evaluar de forma indirecta el efecto citotóxico de distintas cepas de *S. Typhimurium* sobre *D. discoideum* AX4, llevamos a cabo ensayos de infección en los que visualizamos la morfología de las amebas en el tiempo. Para esto, se sembró $\sim 1 \times 10^5$ amebas crecidas axénicamente en medio HL5 en los pocillos de una placa de 96 pocillos

y se incubaron durante toda la noche a 22°C para permitir la adhesión de las amebas al fondo de los pocillos.

Al día siguiente, las distintas cepas de bacterias crecidas durante toda la noche en medio LB fueron llevadas hasta una $OD_{600nm} = 0,2$ con medio LB, lavadas 1 vez en *buffer* Soerensen y luego fueran diluidas 5 veces en *buffer* Soerensen. Posteriormente, el medio HL5 de las amebas sembradas en los pocillos fue reemplazado con 100 μ L de la suspensión de bacterias preparadas en *buffer* Soerensen para obtener una MOI de ~ 100 o ~ 1.000 bacterias/célula. Las placas con las infecciones fueron incubadas a 22°C y la morfología celular de las amebas en cada pocillo se visualizó a diferentes tiempos de infección (0, 15, 30, 60 y 90 min) utilizando un microscopio invertido Motic AE 2000 equipado con un objetivo 40x “Plan Achromatic Phase LWD PL Ph2”. Se obtuvieron imágenes representativas utilizando una cámara digital Moticam 580 (5.0 MP) conectada al puerto trinocular del microscopio utilizando un adaptador de montaje C (0.5x).

10.16 Análisis estadístico y expresión de resultados

La internalización de cada cepa bacteriana en macrófagos y *D. discoideum* se calculó como el porcentaje del cociente promedio entre el recuento de UFC/mL en el tiempo 0 h y el recuento de UFC/mL del correspondiente inóculo inicial. Por su parte, la supervivencia intracelular de cada cepa bacteriana se calculó como el cociente promedio entre el recuento de UFC/mL de los distintos tiempos de infección (1, 3 y 5 h) y el recuento de UFC/mL en el tiempo 0 h. La cuantificación de los autofagosomas se determinó contando el número de autofagosomas por células infectadas, hasta contabilizar un total

de 50 células infectadas. Todos los datos asociados a experimentos de infección *in vitro* corresponden al promedio de al menos 3 réplicas biológicas. En todos los gráficos, las barras de error representan la desviación estándar promedio. La significancia estadística en los análisis se determinó utilizando una ANOVA de una vía con distintas pruebas estadísticas. De esta forma, cuando los análisis se hicieron con respecto a la cepa silvestre (i.e., internalización, supervivencia intracelular, *western blot* y acumulación de autofagosomas) se utilizó la prueba de Dunett, mientras que cuando el análisis fue entre grupos experimentales (i.e., flujo autofágico y *western blot*) se utilizó la prueba de Bonferroni. Todos los análisis se hicieron con un intervalo de confianza mínimo del 95%, considerando estadísticamente significativos a valores $p < 0,05$. Todo el procesamiento estadístico de los datos y la elaboración de gráficos se realizó con el programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.).

11. RESULTADOS

11.1 Participación de los factores de virulencia SopB, SptP y PphB en la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*

Para determinar si los factores de virulencia SopB, SptP y PphB cumplen un rol en la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*, se construyeron las cepas mutantes $\Delta sopB$, $\Delta sptP$ y $\Delta pphB$ derivadas de la cepa virulenta *S. Typhimurium* 14028s usando el método de intercambio alélico por recombinación de productor de PCR mediado por la recombinasa Red del fago λ (*Red-swap*) (Datsenko and Wanner 2000) con modificaciones (Santiviago et al. 2009). En primer lugar, se generaron los productos de PCR desde pCLF4, los que fueron transformados en la cepa receptora WT / pKD46 con el sistema de recombinación λ Red inducido para que estos producto de PCR recombinaran en el cromosoma, sustituyendo los genes *sopB*, *sptP* y *pphB* por un *cassette* de resistencia a kanamicina flanqueado por secuencias FRT. Finalmente, se comprobó el reemplazo alélico en cada mutante mediante amplificación por PCR utilizando parejas de partidores que flanquean el sitio de sustitución (**Figura 5**). Las secuencias de todos los partidores usados para amplificaciones mediante PCR se presentan en la **Tabla 4** y los tamaños de los amplicones con los partidores externos son los siguientes: para *sopB* WT 2432 pb, $\Delta sopB$ 2346 pb, *sptP* WT 2378 pb, $\Delta sptP$ 2246 pb, *pphB* WT 981 pb y $\Delta pphB$ 1924 pb (**Figura 5**).

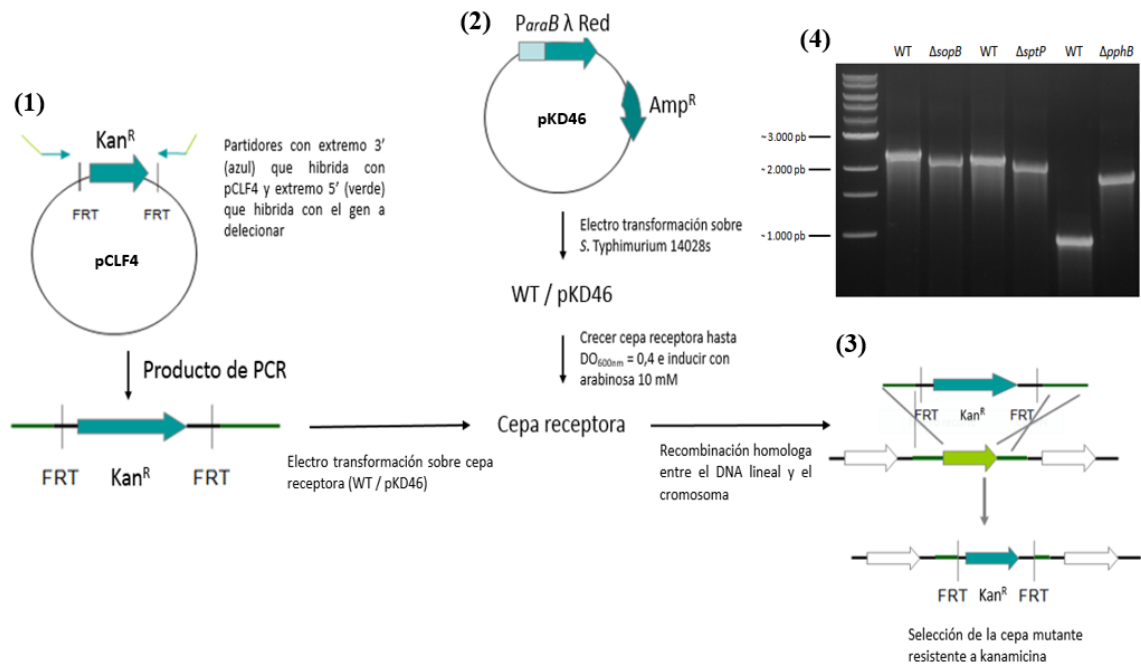


Figura 5. Generación y comprobación de mutantes de *S. Typhimurium*. Para la generación de cada cepa mutante de *S. Typhimurium* se obtuvo un producto de PCR (DNA lineal) desde pCLF4 (1). En paralelo, se generó la cepa receptora que expresa el sistema de recombinación λ Red (WT / pKD46) (2). Una vez hecho esto, se indujo la expresión del sistema Red y se transformó la cepa receptora con cada producto de PCR para la generación de las cepas mutantes por recombinación homóloga (3). La comprobación de las colonias mutantes de cada cepa fue realizada mediante PCR y los productos obtenidos se resolvieron en un gel de agarosa al 1% en *buffer* TAE (4). El estándar de peso molecular utilizado corresponde al 1Kb DNA Ladder (New England Biolabs).

Una vez generadas las cepas mutantes Δ *sopB*, Δ *sptP* y Δ *pphB* de *S. Typhimurium*, realizamos ensayos de infección para evaluar la participación de los factores de virulencia SopB, SptP y PphB de *S. Typhimurium* en la supervivencia intracelular en la ameba *D. discoideum*. Para esto, desarrollamos un nuevo ensayo de infección basado en la determinación de UFC (Figura 6). La principal ventaja de este nuevo ensayo de infección es el reducido volumen de cultivo de amebas requerido, lo que nos permitió evaluar un número mayor de cepas bacterianas en comparación con otros ensayos de infección utilizados en nuestro laboratorio. Brevemente, en este ensayo de infección se mezclaron las cepas bacterianas y las amebas para obtener una MOI de ~ 100 bacterias/ameba. Las

mezclas fueron incubadas a 22°C durante 1 h y lavadas con *buffer* Soerensen suplementado con gentamicina (10 µg/mL) para eliminar las bacterias extracelulares. Posteriormente, las amebas infectadas fueron resuspendidas en *buffer* Soerensen y se obtuvieron alícuotas de la suspensión a 0, 1, 3 y 5 h post infección. Las amebas viables fueron determinadas a cada tiempo mediante tinción con azul de tripán y posterior recuento en cámara de Neubauer. Además, las amebas infectadas recuperadas a cada tiempo fueron lisadas con Triton X-100 al 0,2% y los títulos de las bacterias intracelulares fueron determinados por diluciones seriadas y siembra en agar LB (**ver sección 10.12.2**) (Urrutia et al. 2018).

Para asegurarnos que nuestras cepas de *S. Typhimurium* no generan un efecto tóxico sobre *D. discoideum* en las condiciones de nuestro ensayo de infección, realizamos una versión modificada de un ensayo de infección originalmente diseñado para evaluar la virulencia de bacterias patógenas en base a la morfología celular durante la incubación con *D. discoideum* (Champion et al. 2016; Urrutia et al. 2018). Brevemente, células de *D. discoideum* adheridas en pocillos de una placa de 96 pocillos fueron infectadas con distintas cepas de *S. Typhimurium* a una MOI de ~100 y ~1.000 bacterias/célula, para posteriormente evaluar la morfología celular de las amebas a 0, 30, 60 y 90 min de co-incubación (**ver sección 10.15**).

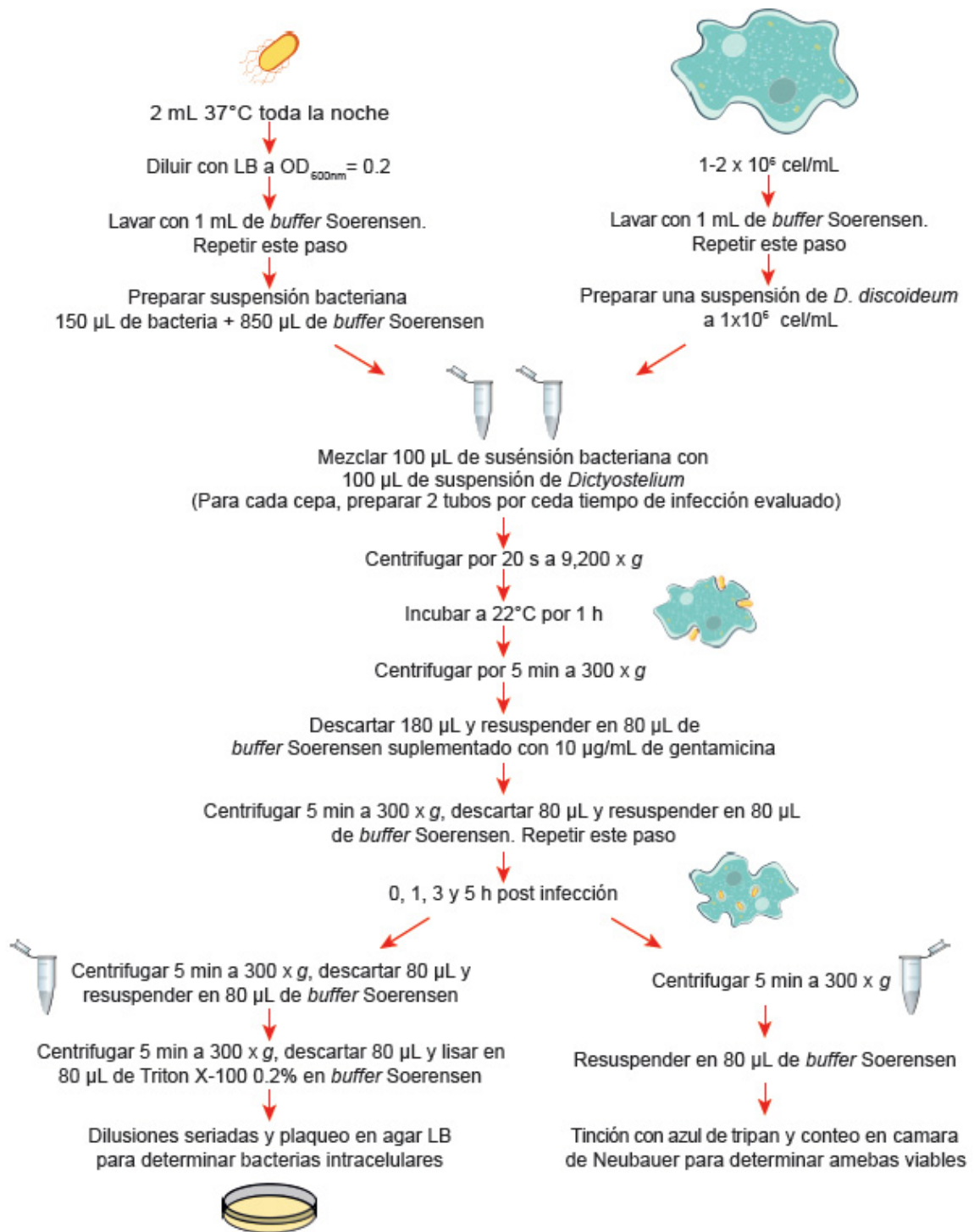


Figura 6. Esquema del ensayo de infección de *S. Typhimurium* en *D. discoideum* (Urrutia et al. 2018).

En nuestros experimentos, se observó que las células infectadas con la cepa silvestre y las distintas cepas mutantes de *S. Typhimurium* a una MOI de ~100 bacterias/ameba no generaron cambios en la morfología celular de la ameba (**Figura 7**). En contraste, durante las infecciones realizadas a una MOI de ~1.000 bacterias/ameba todas las cepas bacterianas evaluadas causaron desprendimiento de amebas de los pocillos y una morfología celular redondeada en todos los tiempos evaluados (**Figura 7**). Estos resultados nos indican que nuestras cepas de *S. Typhimurium* no generan un efecto tóxico sobre *D. discoideum* en las condiciones de nuestro ensayo de infección.

Utilizando nuestro ensayo de infección evaluamos la internalización y la supervivencia intracelular de las distintas cepas de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*. En este ensayo, la internalización de cada cepa se evaluó después de 1 h de infección. Los resultados obtenidos mostraron que las tres cepas mutantes evaluadas ($\Delta sopB$, $\Delta sptP$ y $\Delta pphB$) presentan una internalización superior a la mostrada por la cepa silvestre (**Figura 8**). Es importante destacar que los fenotipos presentados por las cepas mutantes $\Delta sopB$, $\Delta sptP$ y $\Delta pphB$ fueron revertidos por la presencia de un plasmidio que tiene clonado los genes funcionales *sopB* (*psopB*), *sptP* (*psptP*) o *pphB* (*ppphB*) y la presencia del vector vacío (pBAD) no afectó a los fenotipos mostrados por estas mutantes (**Figura 8**).

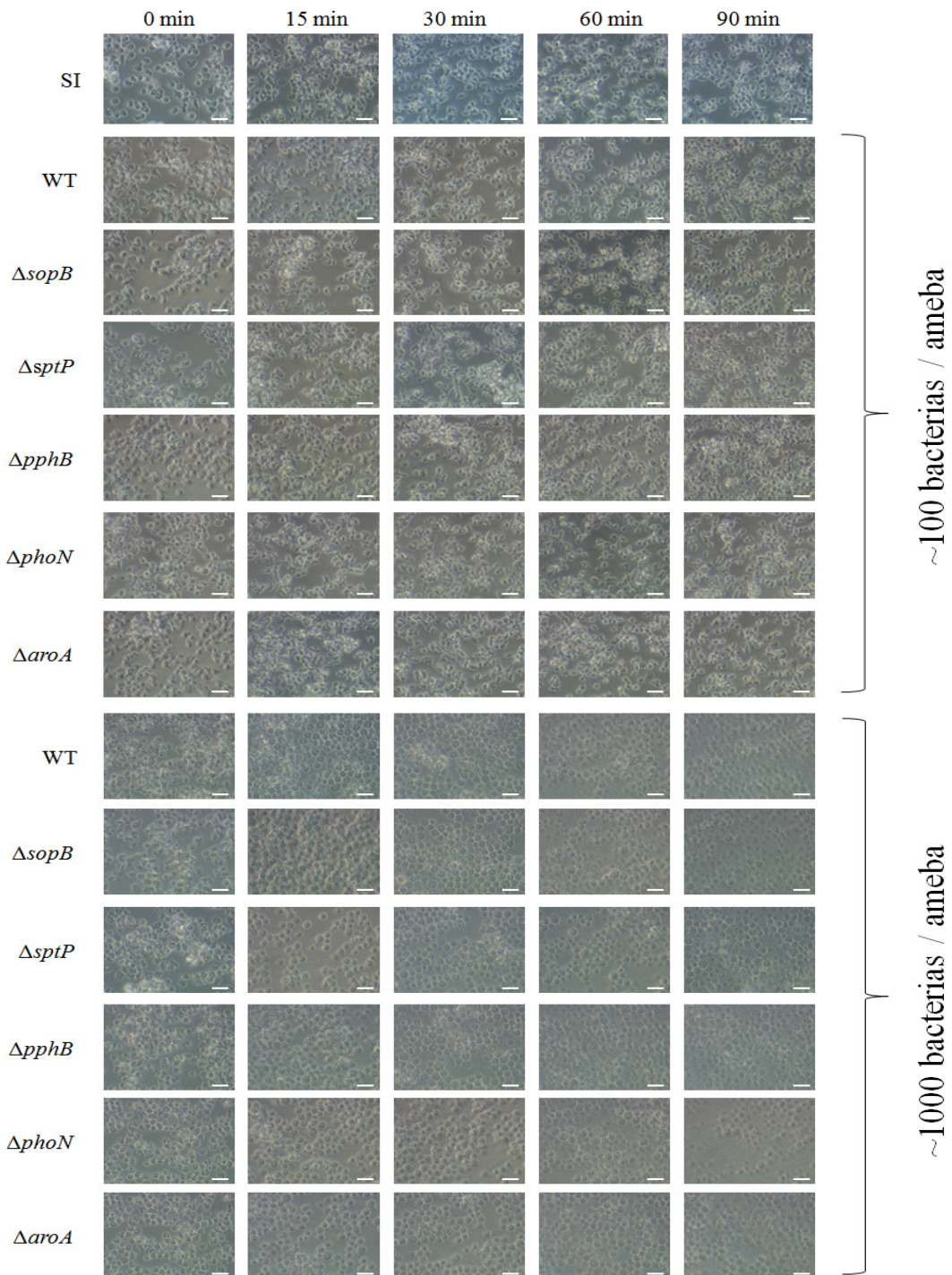


Figura 7. Evaluación cualitativa de la citotoxicidad causada por cepas de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*. La morfología celular de *D. discoideum* AX4 infectada con diferentes cepas de *S. Typhimurium* se observó a los 0, 15, 30, 60 y 90 min de co-incubación a 22°C en *buffer* Soerensen. La figura muestra imágenes representativas de 3 ensayos independientes usando MOIs de ~100 o ~1.000 bacterias/ameba. Barra de escala, 20 μm.

En el ensayo usamos como control la cepa atenuada de *S. Typhimurium* $\Delta aroA$, la cual se internalizó en mayor proporción que la cepa silvestre. Por su parte, también usamos como control la mutante $\Delta phoN$ de *S. Typhimurium* porque no presenta defectos en virulencia en esta ameba y en otros modelos de infección. Como se esperaba, esta mutante se internalizó en niveles comparables al de la cepa silvestre (**Figura 8**).

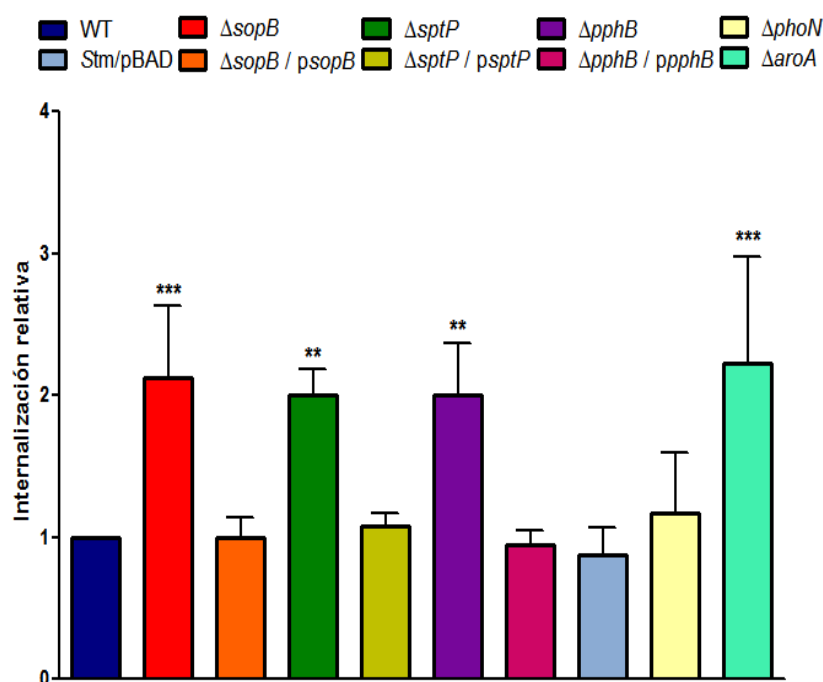


Figura 8. Internalización relativa de cepas de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*. Se infectó la ameba *D. discoideum* durante 1 h a 22°C con la cepa silvestre, las cepas mutantes $\Delta sopB$, $\Delta sptP$ y $\Delta pphB$ y las cepas mutantes complementadas utilizando una MOI de ~100 bacterias/célula y luego se determinaron las bacterias intracelulares. Los valores de internalización fueron calculados como $UFC_{t=0}/UFC_{in\acute{o}culo}$ y luego normalizados al valor de la cepa silvestre. Todos los valores graficados corresponden al promedio de 3 réplicas biológicas y su desviación estándar. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó un ANOVA de una vía y la prueba de Dunnett (**: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Luego de evaluar la internalización de nuestras cepas de *S. Typhimurium*, evaluamos su supervivencia intracelular a 1, 3 y 5 h post infección. Nuestros resultados mostraron que las cepas mutantes $\Delta sopB$, $\Delta sptP$ y $\Delta pphB$ presentan defectos en la supervivencia intracelular en *D. discoideum* a todos los tiempos evaluados (**Figura 9A**). Cabe destacar que los defectos presentados por las mutantes $\Delta sopB$, $\Delta sptP$ y $\Delta pphB$ en la supervivencia intracelular fueron revertidos por la presencia de un plasmidio que tenía clonado el respectivo gen funcional (*psopB*, *psptP* o *ppphB*) y que la presencia del vector vacío (pBAD) no afectó los fenotipos mostrados por estas mutantes (**Figura 9A**). Por su parte, nuestros controles experimentales $\Delta aroA$ y $\Delta phoN$ nuevamente mostraron el fenotipo esperado. La cepa atenuada $\Delta aroA$ presentó un defecto en la supervivencia intracelular, mientras que la cepa $\Delta phoN$ presentó niveles de supervivencia intracelular comparables al de la cepa silvestre (**Figura 9A**). Además, no se observaron diferencias en la viabilidad de las amebas durante el curso de las infecciones con las distintas cepas de *S. Typhimurium*, lo que indica que los fenotipos de internalización o supervivencia intracelular observados no son atribuibles a cambios en el número de amebas viables durante el ensayo (**Figura 9B**).

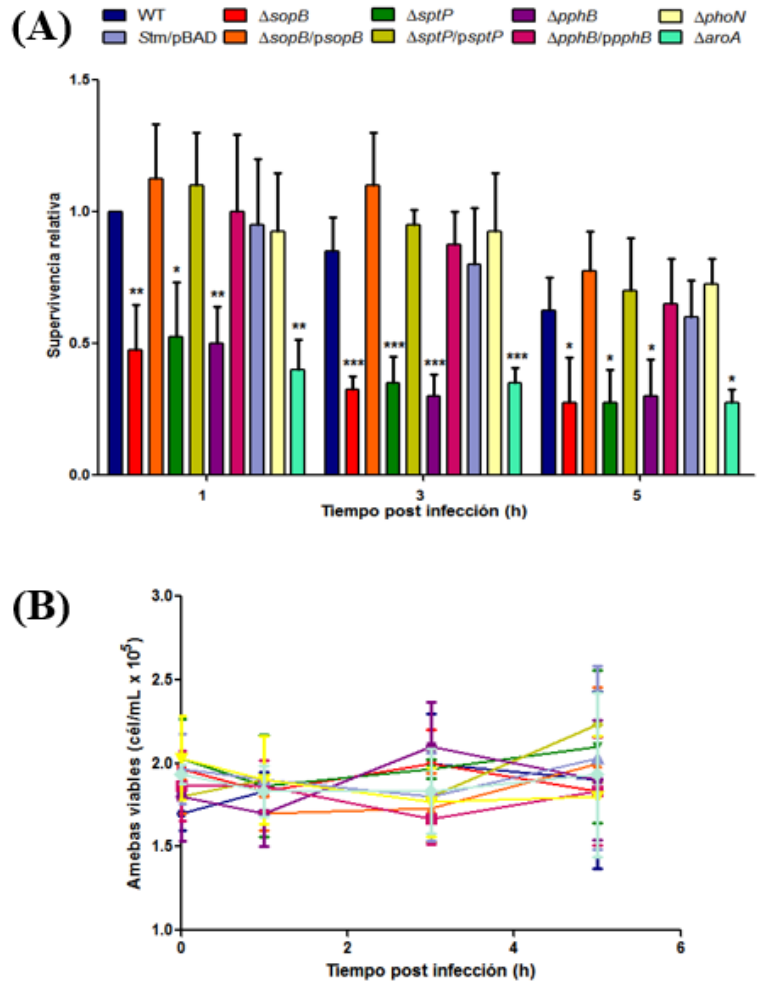


Figura 9. Supervivencia intracelular de cepas de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*. Se infectó la ameba *D. discoideum* durante 1 h a 22°C con la cepa silvestre, cepas mutantes $\Delta sopB$, $\Delta sptP$, $\Delta pphB$ y las correspondientes cepas mutantes complementadas utilizando una MOI de ~ 100 bacterias/célula. Posteriormente, se titularon las bacterias intracelulares a 1, 3 y 5 h post infección. **(A)** Supervivencia relativa expresada como $UFC_{t=x}/UFC_{t=0}$. **(B)** Variación en la población de amebas viables durante el ensayo de infección expresada como células/mL. Todos los valores graficados corresponden al promedio de 3 réplicas biológicas y su desviación estándar. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó un ANOVA de una vía y la prueba de Dunnett (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

En conjunto, nuestros resultados indican que los factores de virulencia SopB, SptP y PphB de *S. Typhimurium* contribuyen a la supervivencia intracelular del patógeno en la ameba *D. discoideum*.

11.2 Participación de los factores de virulencia SopB, SptP y PphB en la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en macrófagos murinos

Para evaluar la internalización y supervivencia intracelular de las distintas cepas de *S. Typhimurium* en macrófagos RAW264.7, llevamos a cabo un ensayo clásico de protección a gentamicina usando una MOI de ~ 100 bacterias/célula. La internalización de cada cepa se evaluó después de 1 h de infección. Los resultados obtenidos en estos ensayos muestran que las cepas mutantes $\Delta sopB$, $\Delta sptP$ y $\Delta pphB$ no presentan diferencias significativas en la internalización en comparación con la cepa silvestre (**Figura 10**). En cuanto a las cepas controles, observamos que la cepa $\Delta aroA$ se internalizó en mayor proporción que la cepa silvestre, mientras que la cepa mutante $\Delta phoN$ se internalizó en niveles comparables al de la cepa silvestre (**Figura 10**).

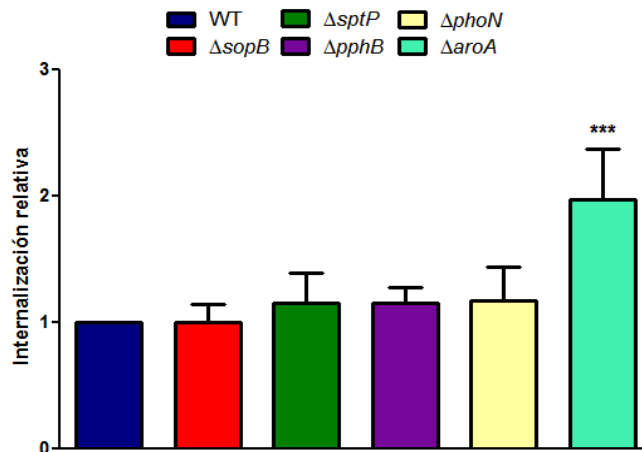


Figura 10. Internalización relativa de cepas de *S. Typhimurium* en macrófagos murinos RAW264.7. Se infectó la línea de macrófagos RAW264.7 durante 1 h a 37°C con la cepa silvestre y las cepas mutantes $\Delta sopB$, $\Delta sptP$ y $\Delta pphB$ utilizando una MOI de ~ 100 bacterias/célula y luego se determinaron las bacterias intracelulares. Los valores de internalización fueron calculados como $UFC_{t=0}/UFC_{in\acute{o}culo}$ y luego normalizado al valor de la cepa silvestre a $t = 1$. Todos los valores graficados corresponden al promedio de 3 réplicas biológicas y su desviación estándar. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó un ANOVA de una vía y la prueba de Dunnett (***: $p < 0,001$).

Posteriormente, se evaluó la supervivencia intracelular de las cepas mutantes de *S. Typhimurium* $\Delta sopB$, $\Delta sptP$ y $\Delta pphB$ a 1, 3 y 5 h post infección. Los resultados obtenidos muestran que la cepa silvestre y las mutantes $\Delta sopB$, $\Delta sptP$ y $\Delta pphB$ no presentan diferencias en la supervivencia intracelular en macrófagos RAW264.7 a todos los tiempos evaluados (**Figura 11**). Por su parte, las cepas control $\Delta aroA$ y $\Delta phoN$ nuevamente mostraron los fenotipos esperados. La mutante $\Delta aroA$ presenta un defecto en la supervivencia intracelular a todos los tiempos post infección evaluados, mientras que la cepa $\Delta phoN$ presenta niveles de supervivencia intracelular comparables a la cepa silvestre (**Figura 11**).

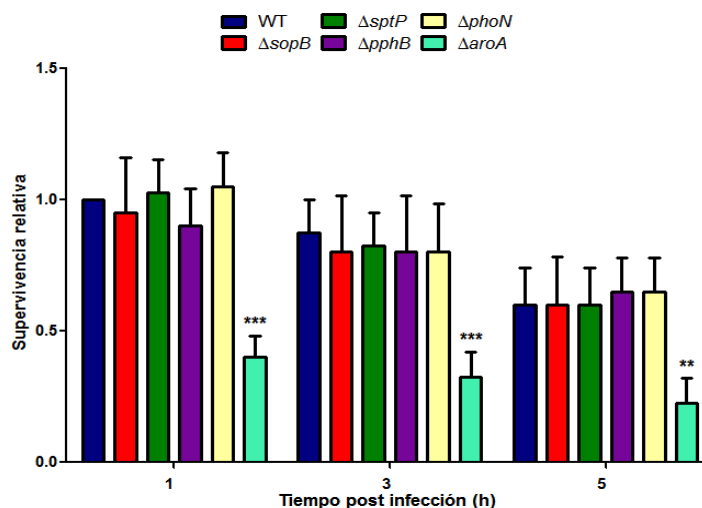


Figura 11. Supervivencia intracelular de cepas de *S. Typhimurium* en macrófagos murinos RAW264.7. Se infectó la línea de macrófagos RAW264.7 durante 1 h a 37°C con la cepa silvestre y cepas mutantes $\Delta sopB$, $\Delta sptP$ y $\Delta pphB$ utilizando una MOI de ~100 bacterias/célula y luego se determinaron las bacterias intracelulares a 1, 3 y 5 h post infección. Los valores de supervivencia fueron calculados como $UFC_{t=x}/UFC_{t=0}$ y luego normalizado al valor de la cepa silvestre a $t = 1$. Todos los valores graficados corresponden al promedio de 3 réplicas biológicas y su desviación estándar. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó un ANOVA de una vía y la prueba de Dunnett (**: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

En base a estos resultados, podemos concluir que las proteínas efectoras SopB, SptP y PphB no contribuyen a la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en la línea de macrófagos RAW264.7 en las condiciones experimentales probadas.

11.3 Participación de los factores de virulencia SopB, SptP y PphB de *S. Typhimurium* en la modulación del proceso autofágico en *D. discoideum*

Para evaluar si las proteínas SopB, SptP y PphB de *S. Typhimurium* son capaces de interferir con la autofagia en *D. discoideum*, se llevaron a cabo ensayos en los cuales se permitió la infección durante 1 h de una cepa derivada de *D. discoideum* AX4 que expresa el marcador fluorescente de autofagia GFP-LC3 usando las cepas mutantes $\Delta sopB$, $\Delta sptP$ y $\Delta pphB$ a una MOI de ~ 500 bacterias/célula (**Figura 12A**).

A partir de las imágenes obtenidas de estos ensayos de infección mediante microscopía confocal (**ver sección 10.13**), cuantificamos manualmente los autofagosomas por célula generados por las distintas cepas de *S. Typhimurium*. Los resultados obtenidos al infectar *D. discoideum* GFP-LC3 con cualquiera de nuestras cepas de *S. Typhimurium*, mostraron una mayor acumulación de autofagosomas (puntos GFP-LC3) por célula, comparado al control correspondiente a *D. discoideum* sin infectar (**Figura 12B**). Sin embargo, observamos que al infectar las amebas con la cepa mutante $\Delta sopB$ se genera una mayor cantidad de autofagosomas por célula en comparación con la cepa silvestre. Por su parte, al infectar las amebas con la cepa mutante $\Delta sptP$ se genera una menor cantidad de autofagosomas por célula en comparación con la cepa silvestre (**Figura 12B**). Cabe mencionar que los fenotipos presentados por las cepas mutantes $\Delta sopB$ y $\Delta sptP$ fueron

revertidos por la presencia de un plasmidio que tiene clonado el respectivo gen funcional (*psopB* o *psptP*) y que la presencia del vector vacío donde fueron clonados estos genes (pBAD) no afectó a los fenotipos mostrados por estas cepas mutantes (**Figura 12B**). Si bien determinamos que la cepa mutante Δ *pphB* no presenta diferencias significativas en la cantidad de autofagosomas en comparación a la cepa silvestre, esta mutante transformada con el plasmidio que tiene clonado *pphB* funcional (*ppphB*) muestra una disminución en la cantidad de autofagosomas comparado a la cepa silvestre (**Figura 12B**). Es importante destacar que en todas las condiciones donde se infectó con cualquiera de nuestras cepas de *S. Typhimurium*, independiente del aumento o disminución en el número de autofagosomas, observamos que no todas las bacterias intracelulares colocalizaron con los autofagosomas generados.

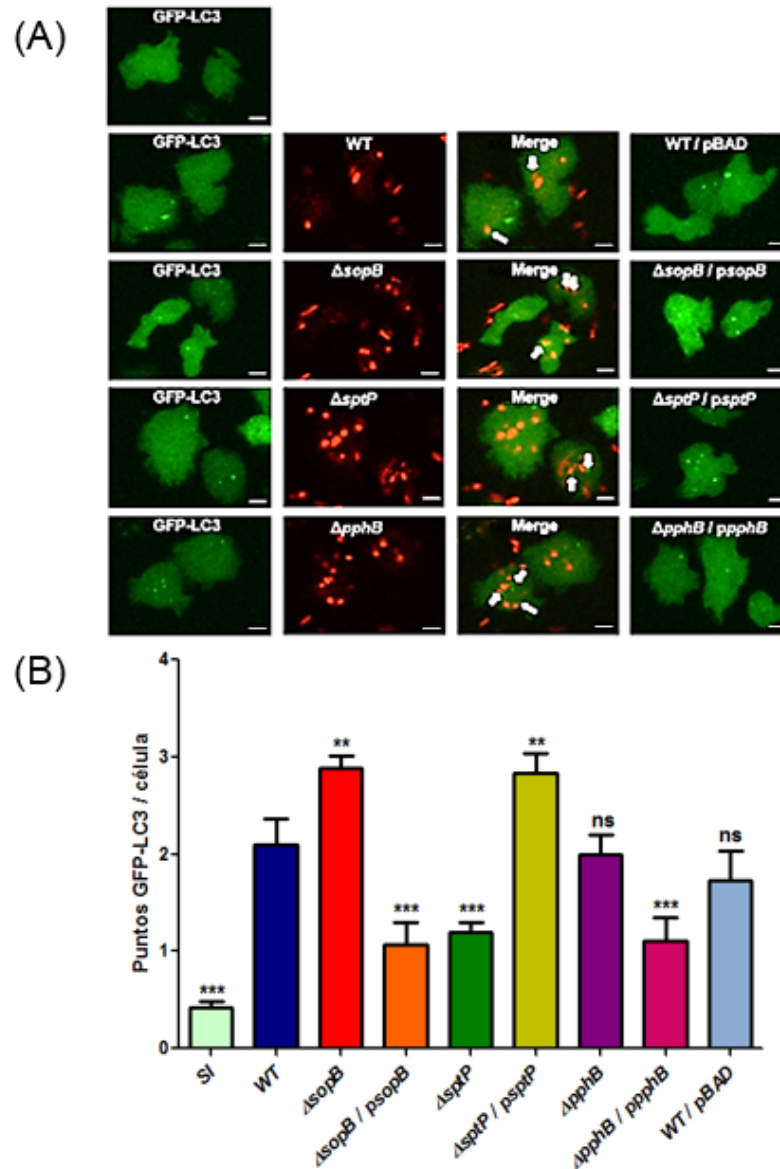


Figura 12. Cuantificación de autofagosomas durante la infección de *D. discoideum* con cepas de *S. Typhimurium*. Se infectó la cepa *D. discoideum* GFP-LC3 durante 1 h a 22°C con la cepa silvestre y las mutantes Δ sopB, Δ sptP y Δ pphB (todas transformadas con el plasmidio pFCcGi que expresa la proteína fluorescente roja mCherry) y las cepas mutantes complementadas utilizando una MOI de ~500 bacterias/célula. (A) Imágenes representativas de *D. discoideum* GFP-LC3 sin infectar o infectada con distintas cepas de *S. Typhimurium*. En la imagen, cada punto verde representa un autofagosoma. Las flechas blancas indican la colocalización de bacterias con autofagosomas. Barra de escala, 10 μ m. (B) Cuantificación correspondiente al número de autofagosomas por célula. Todos los valores graficados corresponden al promedio de 3 réplicas biológicas y su desviación estándar. La significancia estadística de las diferencias en el número de autofagosomas por célula se determinó utilizando un ANOVA de una vía y la prueba de Dunnett (**: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ns: no hay diferencias significativas). SI: sin infectar; WT: cepa silvestre.

Si bien logramos detectar diferencias en la cantidad de autofagosomas por célula al infectar con nuestras distintas cepas de *S. Typhimurium* (**Figuras 12A y B**), estos experimentos no nos permiten evaluar si estos autofagosomas se están fusionando finalmente con los lisosomas (generando los autolisosomas), por lo que no podemos hacer una relación directa de la acumulación de autofagosomas con la degradación del material que contienen por acción de las enzimas hidrolíticas de los lisosomas. Con anterioridad se ha reportado una metodología para monitorear flujo autofágico en *D. discoideum* AX4 infectado con *Mycobacterium marinum*. En este caso, *D. discoideum* no es sensible a los inhibidores farmacológicos de autofagia comúnmente usados (bafilomicina A1 o cloroquina), por lo que los investigadores utilizaron una mezcla comercial de inhibidores de proteasas para inhibir autofagia (Cardenal-Muñoz et al. 2017). De esta manera, si hay una acumulación de autofagosomas en las muestras tratadas con inhibidores de proteasas versus las sin tratar, significa que hay una autofagia activa, ya que un proceso de autofagia activo genera la degradación de autofagosomas, incluyendo la proteína LC3.

Utilizando esta metodología, evaluamos flujo autofágico en *D. discoideum* al infectar esta ameba con las distintas cepas de *S. Typhimurium*. La cuantificación manual de los autofagosomas por célula generados por las distintas cepas de *S. Typhimurium* mostró que en todas las condiciones estudiadas (sin infectar o infectando con la cepa silvestre, las cepas mutantes o las cepas mutantes complementadas) se observa una mayor acumulación de autofagosomas por célula cuando se utiliza el inhibidor de proteasas, lo que nos indica que en todos los casos la autofagia es activa (**Figura 13B**).

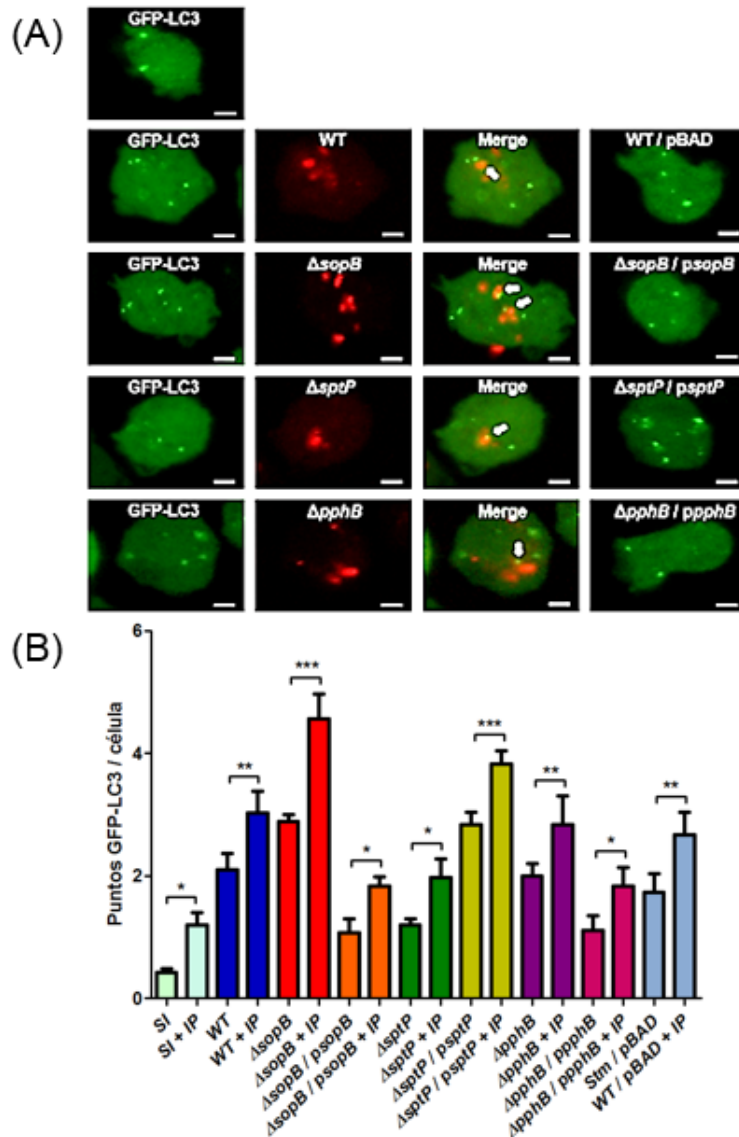


Figura 13. Flujo autofágico durante la infección de *D. discoideum* con cepas de *S. Typhimurium*. Se infectó la cepa *D. discoideum* GFP-LC3 durante 1 h a 22°C con la cepa silvestre y las mutantes $\Delta sopB$, $\Delta sptP$ y $\Delta pphB$ (todas transformadas con el plasmidio pFCcGi que expresa la proteína fluorescente roja mCherry) y las cepas mutantes complementadas utilizando una MOI de ~ 500 bacterias/célula. **(A)** Imágenes representativas de *D. discoideum* GFP-LC3 tratada con inhibidores de proteasas (IP), sin infectar o infectada con distintas cepas de *S. Typhimurium*. En la imagen, cada punto verde representa un autofagosoma. Las flechas blancas indican la colocalización de bacterias con autofagosomas. Barra de escala, 10 μm . **(B)** Cuantificación correspondiente al número de autofagosomas por célula. Todos los valores corresponden al promedio de 3 réplicas biológicas y su desviación estándar. La significancia estadística de las diferencias en el número de autofagosomas por célula se determinó utilizando un ANOVA de una vía y la prueba de Bonferroni (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ns: no hay diferencias significativas). SI: sin infectar; WT: cepa silvestre.

Por lo tanto, estos resultados sugieren que el factor de virulencia SopB de *S. Typhimurium* inhibe la respuesta autofágica en *D. discoideum*, mientras que el factor de virulencia SptP estimula la autofagia en este organismo.

11.4 Participación de los factores de virulencia SopB, SptP y PphB de *S. Typhimurium* en la modulación del proceso autofágico en macrófagos murinos

Para evaluar la contribución de las proteínas SopB, SptP y PphB en la modulación de la autofagia en macrófagos RAW264.7, se utilizó la misma estrategia empleada con *D. discoideum*. En este caso, se realizaron ensayos en los cuales se infectó una línea derivada de los macrófagos RAW264.7 que expresa el marcador fluorescente EGFP-LC3 usando las cepas mutantes $\Delta sopB$, $\Delta sptP$ y $\Delta pphB$. Las infecciones se realizaron durante 1 h usando una MOI de ~500 bacterias/célula (**Figura 14A**).

Interesantemente, los resultados obtenidos a partir de la cuantificación manual de los autofagosomas por célula muestran resultados similares a los obtenidos en *D. discoideum*. Primero, observamos una mayor cantidad de autofagosomas al infectar con cualquiera de nuestras cepas de *S. Typhimurium* comparado a las células sin infectar (**Figura 14B**), mientras que, para la cepa mutante $\Delta sopB$ observamos una mayor acumulación de autofagosomas por célula comparado a la cepa silvestre. Por su parte, en el caso de la cepa mutante $\Delta sptP$ observamos una menor cantidad de autofagosomas por célula comparado a la cepa silvestre (**Figura 14B**). Los fenotipos mostrados en la acumulación de autofagosomas por las cepas mutantes $\Delta sopB$ y $\Delta sptP$ fueron revertidos cuando éstas se transformaron con los plasmidios *psopB* y *psptP*, respectivamente.

Además, la presencia del vector vacío (pBAD) no afectó los fenotipos mostrados por estas mutantes (**Figura 14B**). Por otra parte, nuevamente observamos que la cepa mutante $\Delta pphB$ no genera diferencias en la acumulación de autofagosomas comparado a la cepa silvestre, y que la cepa mutante $\Delta pphB$ transformada con el plasmidio *ppphB* muestra una disminución en la cantidad de autofagosomas comparado a la cepa silvestre (**Figura 14B**). Interesantemente, y al igual como observamos en *D. discoideum*, al infectar macrófagos RAW264.7 con cualquiera de nuestras cepas de *S. Typhimurium* observamos que no todas las bacterias intracelulares colocalizaron con los autofagosomas generados.

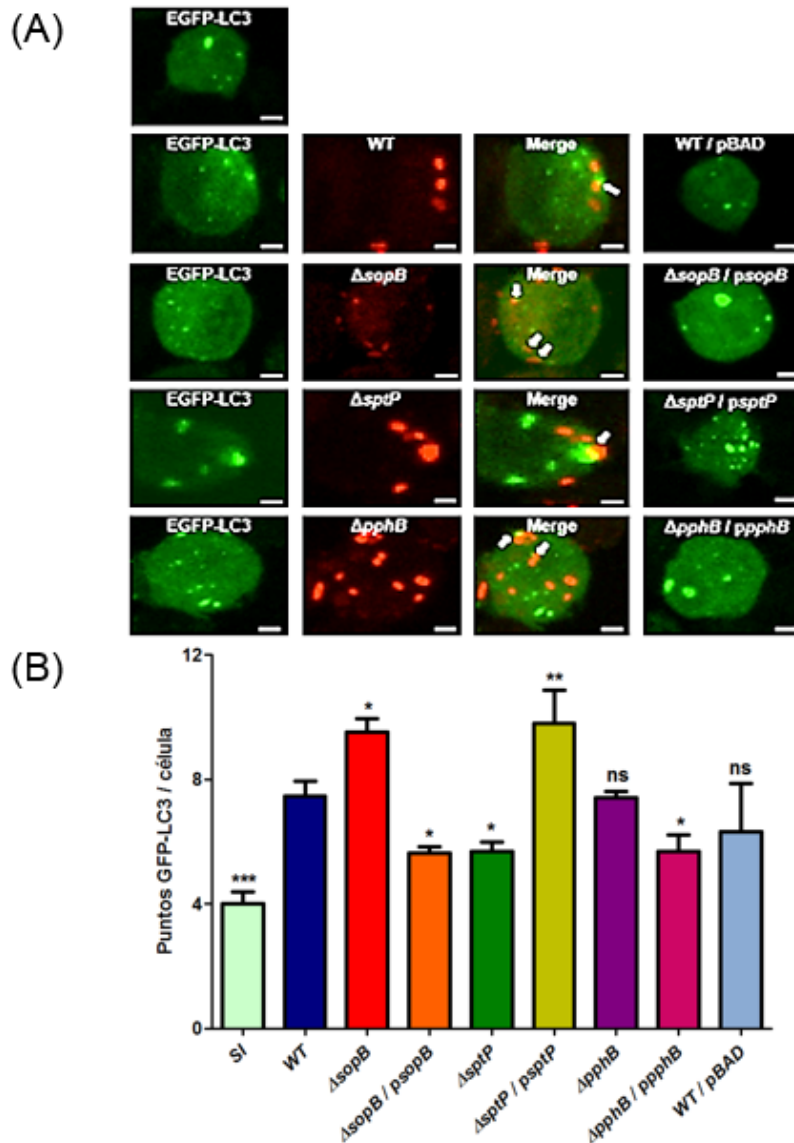


Figura 14. Cuantificación de autofagosomas durante la infección de macrófagos RAW264.7 con cepas de *S. Typhimurium*. Se infectaron los macrófagos de la línea RAW264.7 EGFP-LC3 durante 1 h a 37°C con la cepa silvestre y las mutantes Δ sopB, Δ sptP y Δ pphB (todas transformadas con el plasmidio pFCcGi que expresa la proteína fluorescente roja mCherry) y las cepas mutantes complementadas utilizando una MOI de ~500 bacterias/célula. (A) Imágenes representativas de macrófagos RAW264.7 EGFP-LC3 sin infectar o infectados con distintas cepas de *S. Typhimurium*. En la imagen, cada punto verde representa un autofagosoma. Las flechas blancas indican la colocalización de bacterias con autofagosomas. Barra de escala, 10 μ m. (B) Cuantificación correspondiente al número de autofagosomas por célula. Todos los valores graficados corresponden al promedio de 3 réplicas biológicas y su desviación estándar. La significancia estadística de las diferencias en el número de autofagosomas por célula se determinó utilizando un ANOVA de una vía y la prueba de Dunnett (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ns: no hay diferencias significativas). SI: sin infectar; WT: cepa silvestre.

Nuevamente, y siguiendo con la estrategia utilizada en *D. discoideum*, evaluamos flujo autofágico en macrófagos RAW264.7 pero esta vez utilizando cloroquina, un conocido inhibidor farmacológico de autofagia ampliamente utilizado. En este caso, la cuantificación manual los autofagosomas por célula generados por las distintas cepas de *S. Typhimurium* también mostró que en todas las condiciones estudiadas hay una mayor acumulación de autofagosomas por célula cuando se utiliza cloroquina, lo que nos indica que en todos los casos la autofagia es activa (**Figura 15B**).

De esta forma, al igual que en el caso de *D. discoideum* nuestros resultados sugieren que el factor de virulencia SopB de *S. Typhimurium* inhibe el proceso de autofagia en macrófagos RAW264.7, mientras que el factor de virulencia SptP estimula la respuesta autofágica en esta línea de macrófagos.

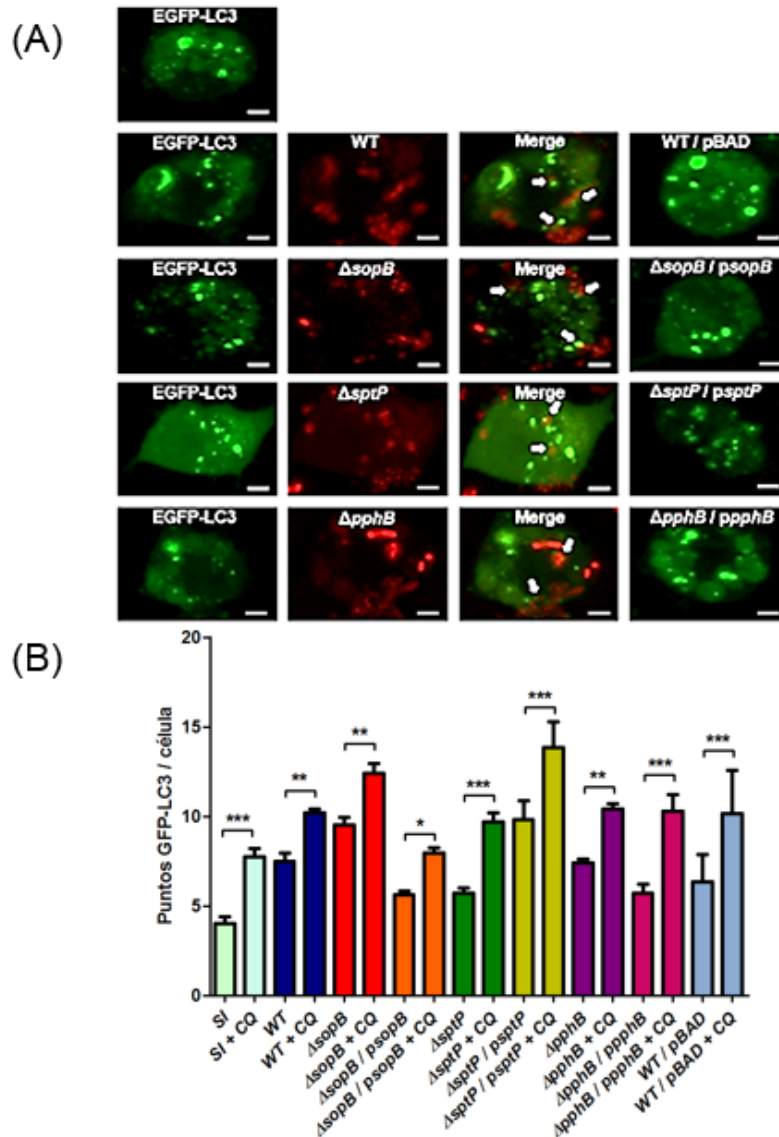


Figura 15. Flujo autofágico durante la infección de macrófagos RAW264.7 con cepas de *S. Typhimurium*. Se infectaron los macrófagos de la línea RAW264.7 EGFP-LC3 durante 1 h a 37°C con la cepa silvestre y las mutantes $\Delta sopB$, $\Delta sptP$ y $\Delta pphB$ (todas transformadas con el plasmidio pFCcGi que expresa la proteína fluorescente roja mCherry) y las cepas mutantes complementadas utilizando una MOI de ~ 500 bacterias/célula. (A) Imágenes representativas de macrófagos RAW264.7 EGFP-LC3 tratados con 50 μM de cloroquina (CQ), sin infectar o infectados con distintas cepas de *S. Typhimurium*. En la imagen, cada punto verde representa un autofagosoma. Las flechas blancas indican la colocalización de bacterias con autofagosomas. Barra de escala, 10 μm . (B) Cuantificación correspondiente al número de autofagosomas por célula. Todos los valores corresponden al promedio de 3 réplicas biológicas y su desviación estándar. La significancia estadística de las diferencias en el número de autofagosomas por célula se determinó utilizando un ANOVA de una vía y la prueba de Bonferroni (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ns: no hay diferencias significativas). SI: sin infectar; WT: cepa silvestre.

11.4.1 Participación de los factores de virulencia SopB, SptP y PphB de *S. Typhimurium* en la modulación de AKT, ERK y mTORC1 durante la infección de *D. discoideum*

Con el objetivo de evaluar la contribución de SopB, SptP y PphB de *S. Typhimurium* en la modulación en vías de señalización que regulan autofagia en *D. discoideum*, se infectaron las amebas con distintas cepas de *S. Typhimurium* para posteriormente detectar las proteínas AKT, ERK1/2, mTOR, p-AKT(T308), p-ERK1/2(T202 y Y204) y p-mTOR(S2448) mediante *western blot* (ver sección 10.14). Brevemente, llevamos a cabo ensayos de infección con distintas cepas de *S. Typhimurium* en *D. discoideum* AX4 durante 1 h a 22°C usando una MOI de ~500 bacterias/célula. Posteriormente, las amebas infectadas fueron lavadas con *buffer* Soerensen para eliminar las bacterias extracelulares y las proteínas totales de *D. discoideum* se obtuvieron lisando las células con *buffer* de lisis *T-PER* para finalmente inmunodetectar las proteínas mencionadas (ver sección 10.14).

Debido a que no hay anticuerpos comerciales disponibles contra las proteínas AKT, ERK1/2, mTOR y sus formas fosforiladas en *D. discoideum*, la detección de dichas proteínas se llevó a cabo con anticuerpos comerciales reactivos contra las proteínas de humano, rata y ratón. Lamentablemente, luego de numerosos intentos no fue posible obtener resultados reproducibles a partir de nuestros ensayos de *western blot*, por lo que decidimos estudiar el rol que cumplen las proteínas efectoras SopB, SptP y PphB de *S. Typhimurium* en estas vías de señalización en macrófagos RAW264.7 en la siguiente sección.

11.4.2 Participación de los factores de virulencia SopB, SptP y PphB de *S. Typhimurium* en la modulación de AKT, ERK y mTORC1 durante la infección de macrófagos murinos

Finalmente, con el objetivo de evaluar la contribución de SopB, SptP y PphB en la regulación en vías de señalización intracelular que regula autofagia, llevamos a cabo ensayos de *western blot* contra las proteínas AKT, ERK, mTOR y sus formas fosforiladas, que dan cuenta de su activación. Para esto, infectamos los macrófagos RAW264.7 con las distintas cepas de *S. Typhimurium* a evaluar durante 1 h a 37°C usando una MOI de ~500 bacterias/célula, para posteriormente extraer proteínas totales de los macrófagos y detectar mediante *western blot* distintas proteínas en vías de transducción de señales intracelulares que regulan autofagia, como AKT, ERK1/2, mTOR y sus formas fosforiladas activas p-AKT(T308), p-ERK1/2(T202 y Y204) y p-mTOR (S2448) (**ver sección 10.14**).

Los resultados en la regulación de AKT muestran que la cepa mutante $\Delta sopB$ genera una disminución significativa en la cantidad relativa de p-AKT, mientras que, al infectar con la cepa mutante $\Delta sptP$ se produce un aumento significativo en la cantidad relativa de p-AKT. Por su parte, las cepas mutantes $\Delta sopB$ y $\Delta sptP$ transformadas con el plasmidio *psopB* y *psptP*, respectivamente, revierten los fenotipos mostrados en la cantidad relativa de p-AKT comparados con las cepa mutantes (**Figura 16 A y B**). Por su parte, la cepa mutante $\Delta pphB$ no presenta efectos sobre la cantidad relativa de p-AKT. Estos resultados sugieren que SopB contribuye a la activación de AKT, mientras que SptP

contribuye en su inactivación en macrófagos murinos. Por su parte, PphB no participa en la regulación de AKT en dichos macrófagos.

Por otro lado, al evaluar la regulación de la proteína ERK observamos que hay un aumento significativo en la cantidad relativa de p-ERK1/2 al infectar con cualquiera de las cepas de *S. Typhimurium* evaluadas en comparación con el control de macrófagos sin infectar (**Figura 16 A y C**). Sin embargo, al analizar estos resultados en detalle nos damos cuenta que no hay diferencias significativas en la cantidad relativa de p-ERK1/2 entre las distintas cepas de *S. Typhimurium* (**Figura 16 A y C**). Por lo tanto, estos resultados sugieren que SopB, SptP y PphB de *S. Typhimurium* no participan en la regulación de ERK en macrófagos murinos.

En cuanto a la regulación de mTORC1, en nuestros ensayos observamos un aumento significativo en la cantidad relativa de p-mTOR al infectar los macrófagos con *S. Typhimurium* en comparación con el control sin infectar (**Figura 16 A y D**). Además, al infectar con la cepa mutante $\Delta sopB$ observamos una disminución significativa en la cantidad relativa de p-mTOR que alcanza valores comparables al control sin infectar, fenotipo que fue revertido cuando la cepa $\Delta sopB$ fue transformada con el plasmidio *psopB* (**Figura 16 A y D**). Por el contrario, observamos que las cepas mutantes $\Delta sptP$ y $\Delta ppbB$ no generan cambios en la cantidad relativa de p-mTOR en los macrófagos infectados (**Figura 16 A y D**). Nuestros resultados sugieren que SopB contribuye a la activación de mTORC1, mientras que SptP y PphB no participan en la regulación de este complejo proteico en macrófagos murinos.

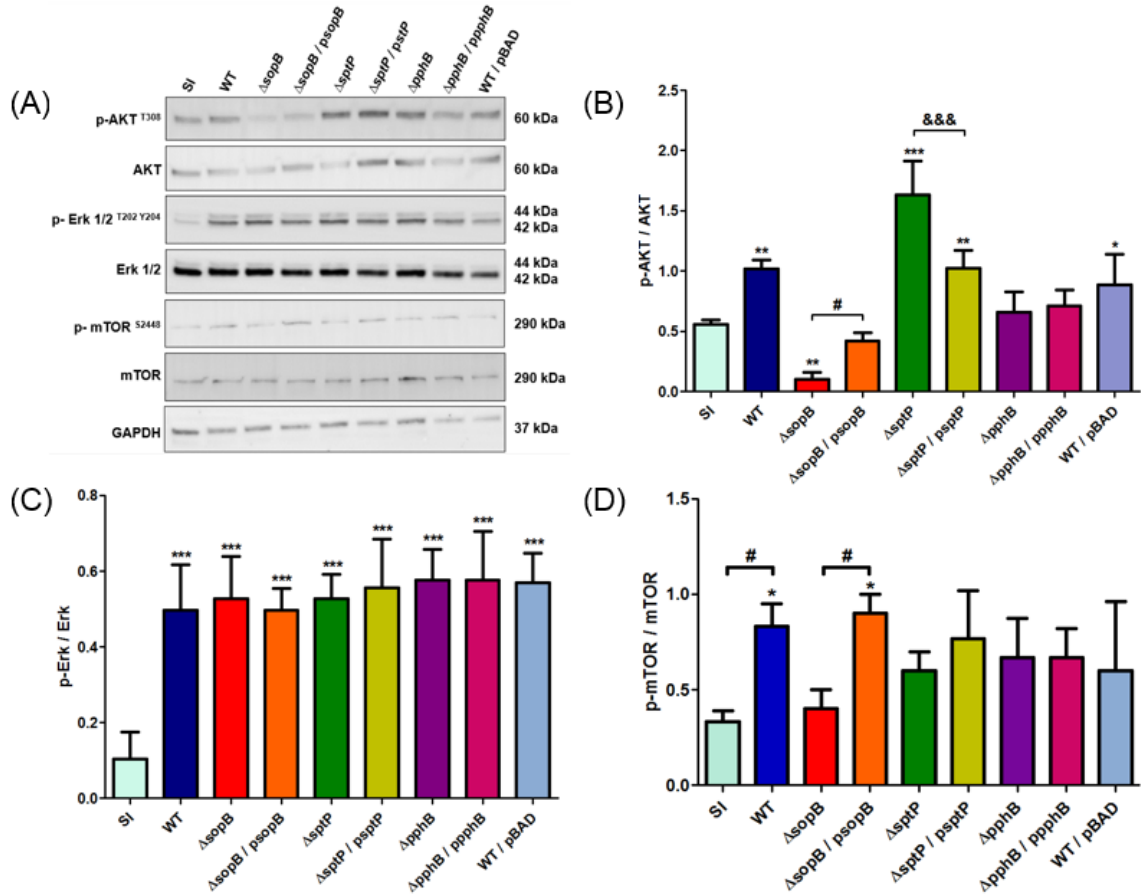


Figura 16. Efecto sobre AKT, ERK y mTORC1 al infectar macrófagos RAW264.7 con distintas cepas de *S. Typhimurium*. Se realizaron ensayos de infección individuales para evaluar si los factores de virulencia SopB, SptP y PphB de *S. Typhimurium* interfieren con la regulación de las proteínas AKT, ERK y mTORC1 en macrófagos RAW264.7. **(A)** Imágenes representativas de los *western blot* contra las proteínas AKT, p-AKT, ERK1/2, p-ERK1/2, mTOR, p-mTOR y el control de carga GAPDH. **(B)** Cuantificación por pixeles de la cantidad relativa de p-AKT durante la infección de distintas cepas de *S. Typhimurium*. **(C)** Cuantificación por pixeles de la cantidad relativa de p-ERK1/2 durante la infección de distintas cepas de *S. Typhimurium*. **(D)** Cuantificación por pixeles de la cantidad relativa de p-mTOR durante la infección de distintas cepas de *S. Typhimurium*. Todos los datos muestran el promedio de al menos 3 ensayos independientes y su desviación estándar. Los valores fueron graficados como el cociente entre la cuantificación de p-proteína y proteína. En **(B)**, la significancia estadística de las diferencias entre las cepas Δ sopB versus Δ sopB / psopB y Δ sptP versus Δ sptP / psptP se determinó utilizando un ANOVA de una vía y la prueba de Bonferroni (#: $p < 0.05$; &&&: $p < 0.001$). En **(D)**, la significancia estadística entre la condición SI versus la cepa silvestre y Δ sopB versus Δ sopB / psopB se determinó utilizando un ANOVA de una vía y la prueba de Bonferroni (#: $p < 0.05$). En **(B)**, **(C)** y **(D)**, las significancia estadística de las diferencias entre cada cepa y la condición sin infectar se determinó utilizando un ANOVA de una vía y la prueba de Dunnett (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

Es importante destacar que la infección con la cepa silvestre de *S. Typhimurium* transformada con el vector vacío (pBAD) muestra un fenotipo comparable al de la cepa silvestre en todos los casos evaluados, indicando que los fenotipos observados no son atribuibles al plasmidio utilizado (**Figura 16**).

En resumen, nuestros resultados sugieren que los factores de virulencia SopB y SptP de *S. Typhimurium* modulan el proceso de autofagia en macrófagos murinos. La proteína efectora SopB genera una regulación negativa de la autofagia, contribuyendo con la activación de AKT y mTORC1. Por su parte, la proteína efectora SptP genera una regulación positiva de la autofagia, contribuyendo en la regulación negativa de AKT. Si bien, no hay anticuerpos comerciales disponibles contra las proteínas AKT, ERK y mTOR de *D. discoideum*, logramos determinar que los efectores SopB y SptP de *S. Typhimurium* modulan el proceso de autofagia en esta ameba. Al igual como ocurre en macrófagos RAW264.7, SopB genera una regulación negativa de la autofagia mientras que SptP genera una regulación positiva sobre este proceso en *D. discoideum*. Por otro lado, observamos que los factores de virulencia SopB, SptP y PphB son requeridos para la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*, pero no en macrófagos murinos en las condiciones probadas.

12. DISCUSIÓN

Como se mencionó, el objetivo de esta tesis consistió en determinar si los factores de virulencia SopB, SptP y PphB modulan el proceso de autofagia, contribuyendo en la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en la ameba *D. discoideum* y en macrófagos murinos. Para llevar a cabo este objetivo, se utilizaron tres estrategias principales: (1) Evaluar mediante ensayos de infección la internalización y supervivencia intracelular de distintas cepas de *S. Typhimurium* en amebas y macrófagos, (2) evaluar la modulación del proceso de autofagia mediante microscopía confocal al infectar con distintas cepas de *S. Typhimurium*, (3) y evaluar la activación de proteínas clave que regulan la autofagia, como AKT, ERK y mTOR en macrófagos mediante ensayos de *western blot* al infectar con distintas cepas de *S. Typhimurium*.

12.1 Desarrollo de un nuevo ensayo de infección para cepas de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*

Para responder el primer objetivo específico de esta tesis, que era evaluar la participación de los factores de virulencia SopB, SptP y PphB de *S. Typhimurium* en la supervivencia intracelular en la ameba *D. discoideum*, fue necesario desarrollar un nuevo ensayo de infección basado en la determinación de UFC intracelulares a distintos tiempos de infección (ver sección 10.12.2 y Figura 6). Este método se basó en un ensayo descrito previamente por nuestro grupo (Riquelme et al. 2016). La principal ventaja de este nuevo método es que utiliza volúmenes más pequeños, y por lo tanto una menor cantidad de

amebas, que los ensayos desarrollados anteriormente por nuestro grupo (Riquelme et al. 2016; Varas et al. 2018). Esto simplifica el manejo de muestras, permitiendo el análisis de más cepas por experimento que los ensayos que requieren volúmenes más grandes. En este ensayo, incluimos como controles experimentales las cepas mutantes $\Delta aroA$ y $\Delta phoN$ de *S. Typhimurium* para validar nuestras observaciones.

Los resultados mostraron que la mutante $\Delta aroA$ se internalizó en mayor número que la cepa silvestre y la mutante $\Delta phoN$ se internalizó en niveles comparables a la cepa silvestre (**Figura 8**). Además, la mutante $\Delta aroA$ presentó defectos en la supervivencia intracelular en la ameba, mientras que la mutante $\Delta phoN$ presentó niveles de supervivencia intracelular comparables a la cepa silvestre (**Figura 9A**). Los resultados obtenidos a partir de nuestros controles con esta nueva metodología son consistentes con otros reportes utilizando una metodología diferente, los que muestran que las mutantes $\Delta aroA$ y $\Delta phoN$ están atenuadas y no atenuadas en este organismo modelo, respectivamente (Riquelme et al. 2016; Varas et al. 2018). Estas observaciones nos permitieron validar nuestro nuevo método de infección para determinar posteriormente si las cepas mutantes $\Delta sopB$, $\Delta sptP$ y $\Delta pphB$ de *S. Typhimurium* presentan deficiencias en la supervivencia intracelular en *D. discoideum*. Es importante destacar que la implementación de este método permitió generar una publicación en la que además se caracterizó la importancia del sistema de translocación de proteínas *twin-arginine translocation* (TAT) en la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum* (Urrutia et al. 2018).

12.2 Contribución de las proteínas efectoras SopB, SptP y PphB en la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium*

Una vez validada nuestra metodología, utilizamos este ensayo de infección para evaluar la participación de los factores de virulencia SopB, SptP y PphB de *S. Typhimurium* en la supervivencia intracelular del patógeno en la ameba *D. discoideum*. En primer lugar, observamos que las cepas mutantes $\Delta sopB$, $\Delta sptP$ y $\Delta pphB$ presentan una mayor internalización comparada con la cepa silvestre (**Figura 8**). Además, observamos que las incubaciones conjuntas de *D. discoideum* con las distintas cepas de *S. Typhimurium* analizadas no produjo cambios en la morfología celular de la ameba bajo las condiciones de infección empleadas, lo que ha sido asociado a citotoxicidad celular (**Figura 7**) (Champion et al. 2016; Urrutia et al. 2018). Por lo tanto, las diferencias en los niveles de internalización presentados por cada cepa en nuestros estudios no son causadas por efectos citotóxicos ejercidos sobre las ameba bajo las condiciones que se utilizan habitualmente en nuestro ensayo de infección (MOI de ~ 100 bacterias/ameba). Con respecto al aumento en la internalización de nuestras cepas mutantes de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*, cabe mencionar que este es un fenotipo que ya habíamos evaluado con anterioridad en otras cepas mutantes en genes relevantes para la virulencia de *Salmonella*, como $\Delta invA$ y $\Delta ssaD$, genes estructurales de los SST3_{SPI-1} y SST3_{SPI-2} respectivamente y la triple mutante $\Delta tatABC$, que corresponden a genes estructurales del sistema de translocación de proteínas TAT (Riquelme et al. 2016; Urrutia et al. 2018). En base a los antecedentes mencionados, creemos que cepas mutantes en genes relevantes para la virulencia de *S. Typhimurium*, generan que esta bacteria patógena sea más susceptible a ser fagocitada por *D. discoideum*. Por otro lado, también se ha reportado que al infectar

células dendríticas con una cepa de *S. Typhimurium* que tiene el SST3_{SPI-1} inactivo, presenta una mayor internalización comparada con la cepa silvestre (Bueno et al. 2010), lo que sustentaría aún más nuestras observaciones.

Posteriormente, evaluamos la supervivencia intracelular de las distintas cepas de *S. Typhimurium* en *D. discoideum* y observamos que tanto $\Delta sopB$, $\Delta sptP$ como $\Delta pphB$ presentan defectos en la supervivencia intracelular a todos los tiempos post infección evaluados (**Figura 9A**). Por lo tanto, SopB, SptP y PphB son requeridos para la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*. Es importante destacar que no se observó ningún efecto en la viabilidad de la ameba durante el curso de las infecciones (**Figura 9B**), lo que indica que los fenotipos mostrados por las diferentes cepas no son atribuibles a cambios en el número de amebas viables durante el transcurso del ensayo. Por el contrario, en cuanto al rol de SopB, SptP y PphB de *S. Typhimurium* en macrófagos RAW264.7, nuestros resultados mostraron que las mutantes $\Delta sopB$, $\Delta sptP$ y $\Delta pphB$ no generan diferencias en la internalización con respecto a la cepa silvestre (**Figura 10**), mientras que la cepa mutante $\Delta aroA$ presenta un aumento en su internalización respecto a la cepa silvestre (**Figura 10**). Así mismo, nuestros resultados mostraron que estas cepas mutantes no generan efectos en la supervivencia intracelular comparadas con la cepa silvestre (**Figura 11**), mientras que la cepa mutante $\Delta aroA$ si presentó defectos en la supervivencia intracelular (**Figura 11**). Por lo tanto, SopB, SptP y PphB no serían requeridos para la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en macrófagos RAW264.7 bajo las condiciones experimentales utilizadas en esta tesis.

Con anterioridad, habíamos reportado que la cepa mutante $\Delta aroA$ de *S. Typhimurium* presenta mayor internalización y posteriormente defectos en la supervivencia intracelular en *D. discoideum* comparado con la cepa silvestre, mientras que la cepa mutante $\Delta phoN$ presentó una internalización y supervivencia intracelular comparables a la cepa silvestre (Urrutia et al. 2018). Además, en otros hospederos está bien documentado que la cepa mutante $\Delta aroA$ de *S. Typhimurium* y de otros serovares de *Salmonella* presentan una fuerte atenuación en diferentes modelos de infección, tanto *in vivo* en terneros, pollos y ratones BALB/c, como *in vitro* en células epiteliales Caco-2, HT-29, macrófagos murinos RAW264.7 y monocitos humanos U937 (Cooper et al. 1990; Fields et al. 1986; Hoiseth and Stocker 1981; Lowe et al. 1999; Stocker et al. 1983). Por su parte, se ha reportado en *D. discoideum* que la cepa mutante $\Delta phoN$ no es una cepa atenuada en este organismo modelo (Riquelme et al. 2016; Varas et al. 2018; Urrutia et al. 2018). Por este motivo, los resultados obtenidos con las cepas atenuada y no atenuada $\Delta aroA$ y $\Delta phoN$ respectivamente en *S. Typhimurium*, fueron esperados y validaron nuestras observaciones.

En cuanto a nuestros resultados con las cepas mutantes $\Delta sopB$, $\Delta sptP$ y $\Delta pphB$, si bien se ha reportado que SopB y SptP son importantes proteínas efectoras de *S. Typhimurium* que participan en la colonización intestinal *in vivo* en ratones BALB/c (Reynolds et al. 2011) y para la supervivencia intracelular en células epiteliales *in vitro* (Murli et al. 2001; Rodríguez-Escudero et al. 2011), la contribución de proteínas efectoras del SST3_{SPI-1} en células fagocíticas no es del todo claro. Se ha descrito que SopB es requerida para el crecimiento intracelular de *S. Typhimurium* en macrófagos murinos derivados de médula ósea (Hernandez et al. 2003), que es similar al fenotipo que

observamos en *D. discoideum*. Por otro lado, al infectar macrófagos RAW264.7 con *S. Typhimurium*, SopB favorece la producción de óxido nítrico a través de la óxido nítrico sintasa en la célula hospedera, proceso que anteriormente se pensaba que sólo era regulado por el SST3_{SPI-2} y sus efectores (Drecktrah et al. 2005). Además, tanto el RNA mensajero como la proteína SopB persisten muchas horas posterior a la internalización del patógeno en estos macrófagos (Drecktrah et al. 2005), sugiriendo un rol en etapas posteriores de la infección. Por otro lado, se ha reportado que la cepa mutante $\Delta invC$ de *S. Typhimurium* (que posee un SST3_{SPI-1} no funcional) presenta una internalización significativamente mayor en células dendríticas en comparación con la cepa silvestre (Bueno et al. 2010). Esto nos indica la importancia del SST3_{SPI-1} en células dendríticas, ya que defectos en este sistema generan que *S. Typhimurium* sea más susceptible a ser fagocitada. Además, ratones C57BL/6 infectados con la cepa mutante $\Delta invC$ mostraron una reducida colonización en hígado, bazo y nódulos linfáticos (Bueno et al. 2010), sugiriendo que el SST3_{SPI-1} de *S. Typhimurium* es importante para la diseminación sistémica en este modelo de infección. Por lo tanto, y en base a estos antecedentes, es plausible que el SST3_{SPI-1} y sus proteínas efectoras podrían cumplir un rol en virulencia en macrófagos y células dendríticas; sin embargo, no se ha logrado establecer las condiciones experimentales *in vitro* adecuadas.

En conjunto, nuestros resultados indican que *S. Typhimurium* requiere de las proteínas efectoras SopB, SptP y PphB para sobrevivir intracelularmente en la ameba *D. discoideum*, pero no requiere estos efectores para sobrevivir en macrófagos murinos bajo las condiciones experimentales utilizadas. Por otra parte, considerando que PphB es una proteína no caracterizada de *S. Typhimurium*, es importante destacar que en este

trabajo de tesis se reporta por primera vez un rol para PphB en la virulencia de *Salmonella*. Además, es la primera vez que se reporta un rol para SopB, SptP y PphB en la internalización y supervivencia intracelular de *Salmonella* en protozoos.

12.3 Rol de las proteínas efectoras SopB, SptP y PphB de *S. Typhimurium* en el control de la autofagia

Las infecciones por *Salmonella* siguen siendo una amenaza para la salud pública debido a su transmisibilidad y su capacidad de evadir los mecanismos de la célula hospedera para controlar la infección. En este contexto, se ha demostrado que la autofagia desempeña un papel importante en la infección por bacterias patógenas intracelulares en macrófagos y células epiteliales. De hecho, se ha descrito que las células hospederas pueden usar la autofagia para eliminar infecciones causadas por *Mycobacterium*, *Salmonella* y *Francisella* (Chiu et al. 2009; Owen and Casanova 2015; Thurston et al. 2009). Por su parte, los patógenos intracelulares como *Salmonella* han desarrollado herramientas para modular etapas específicas del proceso de autofagia (Deretic and Levine 2009), pudiendo establecer un nicho replicativo que permita una colonización eficiente del hospedero. A pesar de los grandes avances obtenidos en la comprensión del papel que juega la autofagia en la respuesta celular frente a bacterias patógenas, no existe un conocimiento acabado respecto a los mecanismos moleculares que utilizan las bacterias patógenas para modular este proceso fisiológico.

En este trabajo de tesis observamos que, tanto en macrófagos RAW264.7 como en *D. discoideum*, la cepa mutante Δ sopB de *S. Typhimurium* generó una mayor acumulación de autofagosomas comparado a la cepa silvestre, siendo ésta una respuesta autofágica activa (flujo autofágico) (**Figuras 12, 13, 14 y 15**). Estos resultados sugieren que SopB de *S. Typhimurium* contribuye en la inhibición de la respuesta autofágica en macrófagos RAW264.7 y *D. discoideum*. Además, en cuanto a las vías de señalización intracelular que regulan autofagia, los resultados obtenidos sugieren que SopB contribuye en la inhibición de la autofagia en macrófagos murinos, tomando control de la vía de señalización AKT/mTORC1 (**Figuras 16A, B y D**). Con respecto a la contribución en la inhibición de la autofagia por *S. Typhimurium*, nuestros resultados fueron consistentes con lo reportado en la literatura. De hecho, se había reportado que SopB de *S. Typhimurium* es un fuerte activador de AKT en células epiteliales HeLa. Esto lo haría con la finalidad de bloquear o retrasar la apoptosis en la célula hospedera infectada (Cooper et al. 2011; Marcus et al. 2001; Roppenser et al. 2013). Otras observaciones asociadas a SopB sugieren un rol para este efector en el mantenimiento de la VCS. Por ejemplo, se ha descrito que en células epiteliales HeLa, SopB recluta a la PI3K de tipo 3 a la VCS por medio de Rab5 (Mallo et al. 2008). Esto es muy importante, ya que la PI3K de tipo 3 de la célula hospedera es una enzima encargada de generar fosfatidilinositol-3-fosfato para iniciar la elongación, nucleación y maduración de la doble membrana que va a formar los autofagosomas (**Figura 3**). De esta forma, SopB además de regular de forma negativa la autofagia al contribuir en la activación de AKT y mTORC1 (**Figuras 14, 15 y 16A, B y D**), estaría secuestrando la PI3K de tipo 3 para reparar la VCS (Mallo et al. 2008). Este proceso sería necesario ya que se ha reportado que durante la infección con *S. Typhimurium* se genera un daño en la membrana de la VCS debido a la

acción del SST3_{SPI-1}, lo que deriva en el reclutamiento del sistema de conjugación Atg12, el cual es esencial para mantener la integridad de la membrana de la VCS. De esta forma, se asegura la acidificación y maduración de este compartimiento vacuolar, lo que permite una correcta expresión de los genes del SST3_{SPI-2} necesarios para la supervivencia del patógeno en su interior de (Kreibich et al. 2015). Finalmente, se describió que SopB genera la acumulación de fosfatidilinositol 3-fosfato en la membrana de la VCS, lo que altera el reclutamiento de moléculas asociadas al tráfico endocítico de la célula hospedera, evitando la fusión de la VCS con los lisosomas (Bakowski et al. 2010; Terebiznik et al. 2002).

Por su parte, la cepa mutante $\Delta sptP$ de *S. Typhimurium* generó una disminución en la acumulación de autofagosomas comparado a la cepa silvestre, pero igualmente existiendo una autofagia activa (flujo autofágico) (**Figuras 12, 13, 14 y 15**), sugiriendo que SptP de *S. Typhimurium* estimula la respuesta autofágica en macrófagos RAW264.7 y *D. discoideum*. Además, nuestros resultados sugieren que SptP de *S. Typhimurium* contribuye en la estimulación de la autofagia en macrófagos RAW264.7 regulando negativamente la proteína AKT, pero de forma independiente de la proteína mTORC1 (**Figuras 14, 15 y 16A, B y D**). Si bien se ha reportado en *S. Typhimurium* que SptP puede inactivar la proteína ERK en células epiteliales (Lin et al. 2003; Murli et al. 2001), también se ha reportado que YopH, una proteína de *Yersinia enterocolitica* que es homóloga a SptP, puede inactivar la proteína AKT en la línea de macrófagos murinos J774-A1 (Sauvonnnet et al. 2002). Por otro lado, nuestros resultados respecto a la proteína ERK sugieren que SptP de *S. Typhimurium* no contribuye en su regulación en macrófagos murinos (**Figuras 16A y C**). Además, nuestros resultados sobre la regulación de AKT por

SptP son consistentes con los datos reportados para YopH de *Y. enterocolitica* en macrófagos. Sin embargo, la contribución de SptP en la regulación positiva de la autofagia de forma independiente a mTORC1 es un poco más compleja.

Sabemos que la autofagia es regulada por la vía PI3K/AKT/mTORC1, donde AKT activa a mTORC1 y este último hiperfosforila al complejo ULK, inhibiendo el inicio de la autofagia (**Figura 4**) (Paquette et al. 2018). A pesar de esto, algunos trabajos han reportado una activación de la autofagia que es independiente de mTORC1. Uno de estos trabajos muestra que AKT puede regular negativamente a la proteína AMPK en células eucariontes (Hardie and Ashford 2014). La proteína AMPK responde a bajos niveles de energía celular, regulando directamente el inicio de la autofagia, activando al complejo ULK de forma independiente de mTORC1 (**Figura 4**) (Paquette et al. 2018). Por otro lado, se ha reportado que AKT puede activar una fosfodiesterasa (PDE3), regulando la acumulación de cAMP (Komalavilas et al. 2001), un segundo mensajero que en conjunto con Beclin-1 pueden activar directamente el inicio de la autofagia (Ugland et al. 2011). Finalmente, también se ha reportado que AKT puede activar al factor transcripcional CREB (Amaravadi 2015), lo que contribuye en la transcripción de genes de respuesta a autofagia, como Atg3, Atg5, Atg7, Beclin-1 y ULK (Füllgrabe et al. 2014). Por lo tanto, estos antecedentes nos indican que es posible que SptP de *S. Typhimurium* regule positivamente la autofagia de una forma dependiente de AKT, pero independiente de mTORC1.

Por otro lado, si bien la cepa mutante $\Delta pphB$ no generó cambios en la cantidad de autofagosomas por célula comparada a la cepa silvestre, la cepa mutante $\Delta pphB$

transformada con el plasmidio *pphB*, mostró una disminución en la cantidad de autofagosomas por célula (**Figuras 12 y 14**), reflejando que esta proteína no cumple un rol fisiológico en la modulación de la autofagia en *D. discoideum* y en macrófagos murinos. Además, en base a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, hemos determinado que la serina/treonina fosfatasa hipotética de *Salmonella* PphB no contribuye en la regulación de la autofagia, o en tomar control de vías de señalización intracelular que regulan este proceso fisiológico en macrófagos RAW264.7, en las condiciones evaluadas (**Figuras 16A y C**).

Es importante destacar que nuestros resultados mostraron que al infectar con cualquiera de nuestras cepas de *S. Typhimurium* ocurre una mayor detección de p-ERK1/2 comparado al control sin infectar (**Figuras 16A y C**). Además, tanto SopB como SptP y PphB de *S. Typhimurium* no contribuyen en la regulación de la proteína ERK1/2 en macrófagos murinos (**Figuras 16A y C**). Estos resultados pueden ser explicados en base a que, en esencia, *Salmonella* genera una respuesta inflamatoria durante su proceso infeccioso (Hansen-Wester and Hensel 2001; Haraga et al. 2008). De hecho, se ha reportado que *S. Typhimurium* genera la activación de NFκB y la producción de citoquinas pro-inflamatorias en macrófagos murinos derivados de médula osea (Rolhion et al. 2016). Por otro lado, se ha reportado que la regulación río abajo de ERK1/2 genera la inhibición del inhibidor de κB (IκB), contribuyendo así en la activación del factor NFκB en células epiteliales PC3 y macrófagos RAW264.7 (Chen et al. 2016; Sun et al. 2017). Además, NFκB es un importante factor transcripcional que regula positivamente la expresión de interleuquina 8 (IL-8), una citoquina de carácter pro-inflamatoria (Elliott et al. 2001). Por

lo tanto, nuestros resultados son coherentes con la contribución de *Salmonella* en la respuesta inflamatoria.

Cabe mencionar que en esta tesis no se logró evaluar la contribución de estas proteínas efectoras en la modulación de las vías de señalización que regulan autofagia en la ameba *D. discoideum*, siendo esta una limitante del estudio. Si bien se utilizaron anticuerpos comerciales reactivos contra humano, rata y ratón que reconocen las proteínas AKT, ERK1/2, mTOR y sus formas fosforiladas activas, fue imposible analizar y detectar estas proteínas en *D. discoideum*. En base a estas observaciones, resulta evidente la necesidad de contar con anticuerpos comerciales que reconozcan específicamente estas proteínas en *D. discoideum* o en su defecto, generar sueros de animales que han sido inmunizados con epítopes clonados de estas proteínas, para entender los aspectos moleculares en la regulación de la autofagia en este organismo modelo.

Por su parte, en este trabajo hemos visto una dinámica molecular donde SopB y SptP presentan roles opuestos en macrófagos murinos. Observamos que en macrófagos RAW264.7, SopB contribuye en la activación de AKT y mTORC1, regulando negativamente la respuesta autofágica. Por otro lado, SptP contribuye en la inactivación de AKT, regulando positivamente la respuesta autofágica de forma independiente de mTORC1. No es algo extraño que *Salmonella* utilice factores de virulencia con funciones antagónicas, ya que se ha reportado que *Salmonella* también toma control de otros procesos fisiológicos, como la polimerización del citoesqueleto de actina en la célula hospedera (Fu and Galan 1998). En primer lugar, las proteínas efectoras SopE y SopB activan las GTPasas Cdc42, Rac1 y RhoG en la célula hospedera. Esto conduce a la

reorganización del citoesqueleto de actina, generando ondulaciones en la membrana plasmática que favorecen la internalización bacteriana por macropinocitosis en las células epiteliales (Rodríguez-Escudero et al. 2011). Curiosamente, se ha demostrado que luego de este proceso el citoesqueleto de actina recupera su arquitectura normal por acción del efector SptP, que ejerce un efecto antagónico al de SopE y SopB al participar en la inactivación de las GTPasas Cdc42 y Rac1 (Murli et al. 2001). Además, se ha reportado un control similar en la inducción de la inflamación durante el proceso infeccioso de *Salmonella*. Si bien se ha reportado que *Salmonella* induce inflamación del tejido intestinal durante el proceso infeccioso (Hansen-Wester and Hensel 2001; Haraga et al. 2008), recientemente se ha reportado un efecto anti-inflamatorio generado por el factor de virulencia SarA de *S. Typhimurium*, contribuyendo en la activación del factor transcripcional STAT3, que posteriormente estimula la transcripción de interleuquina 10 (IL-10) *in vitro* en una línea celular linfoblástide e *in vivo* en ratones C57BL/6 (Jaslow et al. 2018).

Por otro lado, al analizar nuestros resultados con relación a la autofagia, al infectar tanto *D. discoideum* como macrófagos murinos con cualquiera de nuestras cepas de *S. Typhimurium* observamos un aumento en la autofagia comparado a las células sin infectar (**Figuras 13 y 15**). También observamos que no todas las bacterias intracelulares colocalizaron con los autofagosomas. Una observación similar fue reportada anteriormente cuando se infectó células HeLa con *S. Typhimurium*, mostrando que sólo el 20% de las bacterias intracelulares colocalizaban con la maquinaria de autofagia (Birmingham et al. 2006). Además, anteriormente habíamos reportado que *S. Typhimurium* tiene la capacidad de replicarse intracelularmente en *D. discoideum* a las

24 h post infección en un ensayo en el que la infección se mantuvo en un *buffer* sin nutrientes (Urrutia et al. 2018). Analizando en conjunto nuestros resultados y los antecedentes presentados, creemos que *Salmonella* se beneficia de los nutrientes generados por acción de la autofagia, para sobrevivir y proliferar intracelularmente.

Al comparar los resultados obtenidos al infectar *D. discoideum* y macrófagos murinos con distintas cepas de *S. Typhimurium*, observamos que en ambas células fagocíticas el factor de virulencia SopB inhibe el proceso de autofagia, mientras que SptP estimula dicho proceso, apoyando la idea que durante la evolución esta bacteria patógena se entrenó en manipular procesos celulares eucariontes a partir de su interacción con protozoos predadores, para posteriormente utilizarlos para su interacción con los macrófagos. Estas observaciones también apoyan la idea que los genes implicados en la supervivencia intracelular de *Salmonella* en células de hospederos animales también serían necesarios para su interacción con amebas de vida libre, sugiriendo que *S. Typhimurium* utiliza un conjunto común de genes para sobrevivir dentro de amebas y macrófagos. Si bien se ha estudiado bastante sobre los mecanismos moleculares que utiliza *Salmonella* para sobrevivir en los macrófagos, dichos mecanismos son pobremente entendidos en protozoos.

A pesar que *S. Typhimurium* modula la autofagia en *D. discoideum* y en macrófagos murinos, nuestros resultados muestran que dicho proceso repercute en la supervivencia intracelular del patógeno sólo en *D. discoideum*. Estas observaciones sugieren que la autofagia es el principal mecanismo de defensa de esta ameba contra *Salmonella*, a diferencia de lo que ocurriría en macrófagos murinos, lo que podría dar

cuenta de las diferencias observadas en la supervivencia intracelular de esta bacteria en ambas células fagocíticas. En cuanto a esto, se ha reportado que el proceso de autofagia es determinante para el ciclo de vida de *D. discoideum*, ya que la muerte celular de esta ameba está dirigida íntegramente por medio de este proceso fisiológico (Levraud et al. 2003; Tresse et al. 2008). Asimismo, se ha reportado que la autofagia es importante para la eliminación de bacterias patógenas como *Salmonella* (Jia et al. 2009). Por el contrario, si bien se ha estudiado bastante sobre los mecanismos moleculares que utiliza *Salmonella* para sobrevivir dentro de los macrófagos, no se conoce el real impacto de la autofagia como proceso requerido para el control de patógenos intracelulares. Además, hay que considerar que en esta tesis caracterizamos dos efectores de *S. Typhimurium*, SopB y SptP, que modulan este proceso fisiológico; sin embargo, esta bacteria cuenta con otras proteínas efectoras que podrían tomar control de la autofagia para ejercer un efecto en los macrófagos, y que al parecer no serían necesarios en *D. discoideum*. Por ejemplo, recientemente se reportó que la proteína efectora SopF de *S. Typhimurium* ADP-ribosila una vATPasa presente en la VCS, impidiendo el reclutamiento de la maquinaria autofágica y, por consecuencia, inhibiendo este proceso fisiológico, lo que finalmente contribuiría a la replicación intracelular de *S. Typhimurium* en células epiteliales HeLa (Xu et al. 2019). Considerando que SopF es secretado por *S. Typhimurium* durante la infección de macrófagos J774.A1 (Lau et al. 2019), este efector podría contribuir en la supervivencia de *S. Typhimurium* modulando la autofagia en macrófagos murinos.

12.4 Modulación de la autofagia mediada por las proteínas efectoras SopB y SptP de *S. Typhimurium* durante la infección de macrófagos murinos

Durante la infección de una célula eucarionte con una bacteria patógena intracelular, el desbalance de la autofagia puede generar dos escenarios: por una parte, se ha reportado que al infectar con *S. Typhimurium* cepas de *D. discoideum* deficientes en autofagia, las bacterias intracelulares proliferaron de una manera excesiva, generando la rápida muerte de la célula hospedera (Jia et al. 2009). Además, al infectar con *S. Typhimurium* macrófagos RAW264.7 que fueron tratados con el inductor de autofagia rapamicina, éstos eliminaron por completo las bacterias intracelulares (Chiu et al. 2009). Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos en esta tesis sobre las funciones antagónicas de SopB y SptP en la regulación de la autofagia, más los antecedentes reportados, proponemos un modelo donde *Salmonella* modula la autofagia manteniendo un balance de este proceso fisiológico durante la infección, para obtener nutrientes y generar un nicho replicativo estable (**Figura 17**). En condiciones normales, ciertas señales extracelulares, activan a un receptor que posee actividad tirosina quinasa (RTK) localizado en la membrana plasmática de la célula eucarionte. Posteriormente, la PI3K de tipo 1 reconoce las tirosinas fosforiladas del receptor y es reclutada a la membrana plasmática para generar PIP3 a partir de PIP2. Así, tanto la proteína PDK1 como AKT son reclutadas a dicha membrana por medio del dominio homólogo a pleckstrina (PH) que reconoce el PIP3. De esta manera, las proteínas PDK1 y mTORC2 fosforilan a la proteína AKT para activarla. La proteína AKT activa, genera la activación de mTORC1 para finalmente inhibir el inicio de la autofagia. Durante la infección con *S. Typhimurium*, la proteína efectora SopB favorece la generación de PIP3, generando la activación de AKT,

mTORC1 y la consecuente inhibición de la respuesta autofágica. Por el contrario, la proteína efectora SptP contribuye en la regulación negativa de AKT por un mecanismo todavía desconocido, generando la estimulación del proceso de autofagia de forma independiente de mTORC1. De esta forma, *Salmonella* modularía la autofagia en su beneficio para obtener los nutrientes generados a partir de este proceso fisiológico celular (Figura 17).

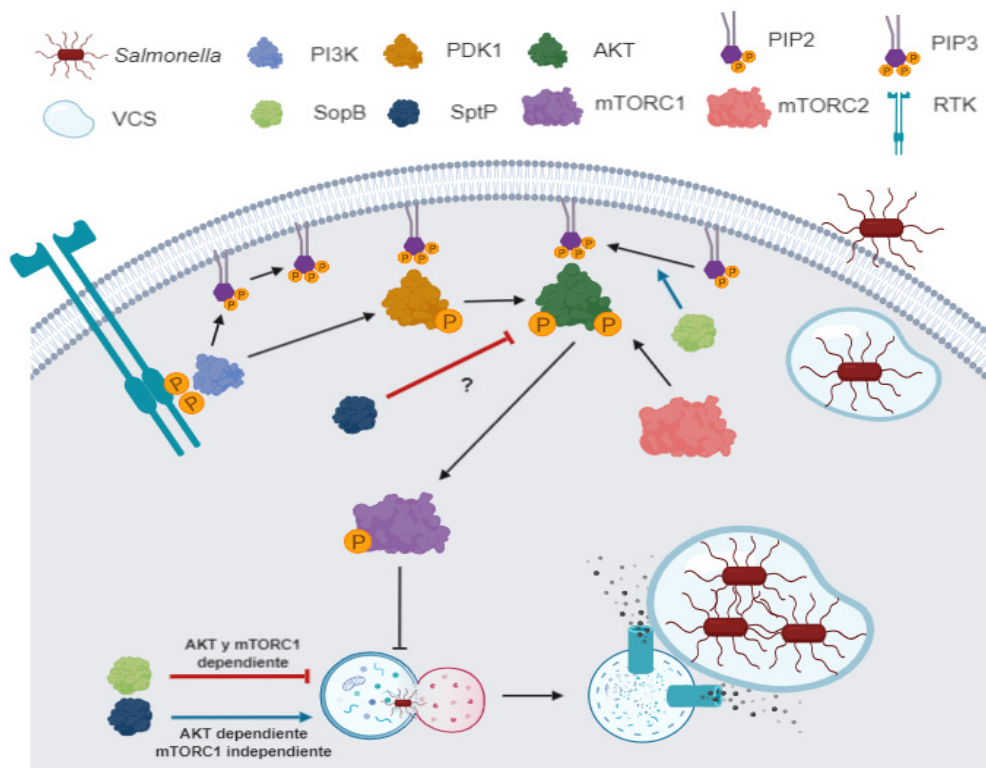


Figura 17. Modulación de la autofagia en macrófagos RAW264.7 mediada por los efectores SopB y SptP de *S. Typhimurium*. La modulación de la autofagia por *S. Typhimurium* es contribuida por dos factores de virulencia, por un lado SopB contribuye a la inhibición de la autofagia de forma dependiente de AKT y mTORC1, mientras que SptP contribuye en la estimulación de la autofagia de forma dependiente de AKT, pero independiente de mTORC1. Esta regulación de la autofagia permitiría la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* y su replicación intracelular, probablemente evitando la eliminación bacteriana y permitiendo la obtención de nutrientes generados por la autofagia.

13. CONCLUSIONES

- I. Los factores de virulencia SopB, SptP y PphB contribuyen a la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en la ameba *D. discoideum*.
- II. Los factores de virulencia SopB, SptP y PphB no contribuyen a la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en macrófagos murinos.
- III. El factor de virulencia SopB de *S. Typhimurium* contribuye en la inhibición del proceso de autofagia en *D. discoideum* y macrófagos murinos.
- IV. El factor de virulencia SopB de *S. Typhimurium* contribuye en la regulación positiva de la vía AKT/mTORC1 en macrófagos murinos.
- V. El factor de virulencia SptP de *S. Typhimurium* contribuye en la estimulación del proceso de autofagia en *D. discoideum* y macrófagos murinos.
- VI. El factor de virulencia SptP de *S. Typhimurium* contribuye en la regulación negativa de AKT en macrófagos murinos.
- VII. El factor de virulencia PphB de *S. Typhimurium* no contribuye en la modulación de la autofagia en *D. discoideum* y macrófagos murinos o en las vías de señalización que regulan este proceso en macrófagos murinos.

Finalmente, nuestros resultados indican que los factores de virulencia SopB, SptP y PphB de *S. Typhimurium* contribuyen a la supervivencia intracelular de este patógeno en la ameba *D. discoideum*, pero no en macrófagos murinos. A pesar de esta diferencia, en ambas células fagocíticas SopB inhibe la autofagia, mientras que SptP estimula este proceso fisiológico, sugiriendo que la autofagia es el principal mecanismo de defensa de *D. discoideum* contra *Salmonella*, a diferencia de lo que ocurriría en macrófagos murinos.

14. REFERENCIAS

- Abraham, D., K. Podar, M. Pacher, M. Kubicek, N. Welzel, B. A. Hemmings, S. M. Dilworth, H. Mischak, W. Kolch, and M. Baccarini. 2000. Raf-1-associated protein phosphatase 2A as a positive regulator of kinase activation. *J Biol Chem* 275 (29):22300-22304.
- Amaravadi, R. K. 2015. Transcriptional regulation of autophagy in RAS-driven cancers. *J Clin Invest* 125 (4):1393-1395.
- Anjum, M. F., C. Marooney, M. Fookes, S. Baker, G. Dougan, A. Ivens, and M. J. Woodward. 2005. Identification of core and variable components of the *Salmonella enterica* subspecies I genome by microarray. *Infect Immun* 73 (12):7894-7905.
- Bakowski, M. A., V. Braun, G. Y. Lam, T. Yeung, W. D. Heo, T. Meyer, B. B. Finlay, S. Grinstein, and J. H. Brumell. 2010. The phosphoinositide phosphatase SopB manipulates membrane surface charge and trafficking of the *Salmonella*-containing vacuole. *Cell Host Microbe* 7 (6):453-462.
- Barker, J., T. J. Humphrey, and M. W. Brown. 1999. Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease. *FEMS Microbiol Lett* 173 (2):291-295.
- Bhaskar, P. T., and N. Hay. 2007. The two TORCs and Akt. *Dev Cell* 12 (4):487-502.
- Birmingham, C. L., A. C. Smith, M. A. Bakowski, T. Yoshimori, and J. H. Brumell. 2006. Autophagy controls *Salmonella* infection in response to damage to the *Salmonella*-containing vacuole. *J Biol Chem* 281 (16):11374-11383.
- Bleasdale, B., P. J. Lott, A. Jagannathan, M. P. Stevens, R. J. Birtles, and P. Wigley. 2009. The *Salmonella* pathogenicity island 2-encoded type III secretion system is essential for the survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in free-living amoebae. *Appl Environ Microbiol* 75 (6):1793-1795.
- Bozzaro, S., and L. Eichinger. 2011. The professional phagocyte *Dictyostelium discoideum* as a model host for bacterial pathogens. *Curr Drug Targets* 12 (7):942-954.
- Bueno, S. M., A. Wozniak, E. D. Leiva, S. A. Riquelme, L. J. Carreno, W. D. Hardt, C. A. Riedel, and A. M. Kalergis. 2010. *Salmonella* pathogenicity island 1 differentially modulates bacterial entry to dendritic and non-phagocytic cells. *Immunology* 130 (2):273-287.

- Calvo-Garrido, J., S. Carilla-Latorre, Y. Kubohara, N. Santos-Rodrigo, A. Mesquita, T. Soldati, P. Golstein, and R. Escalante. 2010. Autophagy in *Dictyostelium*: genes and pathways, cell death and infection. *Autophagy* 6 (6):686-701.
- Calvo-Garrido, J., S. Carilla-Latorre, A. Mesquita, and R. Escalante. 2011. A proteolytic cleavage assay to monitor autophagy in *Dictyostelium discoideum*. *Autophagy* 7 (9):1063-1068.
- Calvo-Garrido, J., J. S. King, S. Muñoz-Braceras, and R. Escalante. 2014. Vmpl regulates PtdIns3P signaling during autophagosome formation in *Dictyostelium discoideum*. *Traffic* 15 (11):1235-1246.
- Cardenal-Muñoz, E., S. Arafah, A. T. López-Jiménez, S. Kicka, A. Falaise, F. Bach, O. Schaad, J. S. King, M. Hagedorn, and T. Soldati. 2017. *Mycobacterium marinum* antagonistically induces an autophagic response while repressing the autophagic flux in a TORC1- and ESX-1-dependent manner. *PLoS Pathog* 13 (4):e1006344.
- Carter, P. B., and F. M. Collins. 1974. Growth of typhoid and paratyphoid bacilli in intravenously infected mice. *Infect Immun* 10 (4):816-822.
- CDC. 2005. *Salmonella* Annual Summary 2005 (Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Institute of Infectious Diseases).
- Cemma, M., and J. H. Brumell. 2012. Interactions of pathogenic bacteria with autophagy systems. *Curr Biol* 22 (13):R540-545.
- Cemma, M., P. K. Kim, and J. H. Brumell. 2011. The ubiquitin-binding adaptor proteins p62/SQSTM1 and NDP52 are recruited independently to bacteria-associated microdomains to target *Salmonella* to the autophagy pathway. *Autophagy* 7 (3):341-345.
- Cirillo, J. D., S. Falkow, L. S. Tompkins, and L. E. Bermudez. 1997. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect Immun* 65 (9):3759-3767.
- Cooper, G. L., R. A. Nicholas, G. A. Cullen, and C. E. Hormaeche. 1990. Vaccination of chickens with a *Salmonella enteritidis aroA* live oral *Salmonella* vaccine. *Microb Pathog* 9 (4):255-265.
- Cooper, K. G., S. Winfree, P. Malik-Kale, C. Jolly, R. Ireland, L. A. Knodler, and O. Steele-Mortimer. 2011. Activation of Akt by the bacterial inositol phosphatase, SopB, is wortmannin insensitive. *PLoS One* 6 (7):e22260.
- Champion, A. C., N. K. Houston, R. S. Bradbury, and D. W. Reid. 2016. Preliminary feasibility and modelling of a liquid matrix *Dictyostelium discoideum* virulence assay for *Pseudomonas aeruginosa*. *Br J Biomed Sci* 73 (2):51-55.

- Chen, B., J. Liu, T. T. Ho, X. Ding, and Y. Y. Mo. 2016. ERK-mediated NF-kappaB activation through ASIC1 in response to acidosis. *Oncogenesis* 5 (12):e279.
- Chiu, H. C., S. Soni, S. K. Kulp, H. Curry, D. Wang, J. S. Gunn, L. S. Schlesinger, and C. S. Chen. 2009. Eradication of intracellular *Francisella tularensis* in THP-1 human macrophages with a novel autophagy inducing agent. *J Biomed Sci* 16:110.
- Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (12):6640-6645.
- Deretic, V. 2012. Autophagy as an innate immunity paradigm: expanding the scope and repertoire of pattern recognition receptors. *Curr Opin Immunol* 24 (1):21-31.
- Deretic, V., and B. Levine. 2009. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe* 5 (6):527-549.
- Deretic, V., T. Saitoh, and S. Akira. 2013. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 13 (10):722-737.
- Desai, P. T., S. Porwollik, F. Long, P. Cheng, A. Wollam, V. Bhonagiri-Palsikar, K. Hallsworth-Pepin, S. W. Clifton, G. M. Weinstock, and M. McClelland. 2013. Evolutionary Genomics of *Salmonella enterica* Subspecies. *mBio* 4 (2):e00198-13.
- Drecktrah, D., L. A. Knodler, K. Galbraith, and O. Steele-Mortimer. 2005. The *Salmonella* SPI1 effector SopB stimulates nitric oxide production long after invasion. *Cell Microbiol* 7 (1):105-113.
- Dupont, N., S. Lacas-Gervais, J. Bertout, I. Paz, B. Freche, G. T. Van Nhieu, F. G. van der Goot, P. J. Sansonetti, and F. Lafont. 2009. *Shigella* phagocytic vacuolar membrane remnants participate in the cellular response to pathogen invasion and are regulated by autophagy. *Cell Host Microbe* 6 (2):137-149.
- Elliott, C. L., V. C. Allport, J. A. Loudon, G. D. Wu, and P. R. Bennett. 2001. Nuclear factor-kappa B is essential for up-regulation of interleukin-8 expression in human amnion and cervical epithelial cells. *Mol Hum Reprod* 7 (8):787-790.
- Essig, A., M. Heinemann, U. Simnacher, and R. Marre. 1997. Infection of *Acanthamoeba castellanii* by *Chlamydia pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol* 63 (4):1396-1399.
- Feasey, N. A., G. Dougan, R. A. Kingsley, R. S. Heyderman, and M. A. Gordon. 2012. Invasive non-typhoidal *salmonella* disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. *Lancet* 379 (9835):2489-2499.
- Feng, Y., D. He, Z. Yao, and D. J. Klionsky. 2014. The machinery of macroautophagy. *Cell Res* 24 (1):24-41.

- Feng, Y., Y. H. Hsiao, H. L. Chen, C. Chu, P. Tang, and C. H. Chiu. 2009. Apoptosis-like cell death induced by *Salmonella* in *Acanthamoeba rhyodes*. *Genomics* 94 (2):132-137.
- Fields, P. I., R. V. Swanson, C. G. Haidaris, and F. Heffron. 1986. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (14):5189-5193.
- Figueira, R., K. G. Watson, D. W. Holden, and S. Helaine. 2013. Identification of *salmonella* pathogenicity island-2 type III secretion system effectors involved in intramacrophage replication of *S. enterica* serovar typhimurium: implications for rational vaccine design. *mBio* 4 (2):e00065.
- Fookes, M., G. N. Schroeder, G. C. Langridge, C. J. Blondel, C. Mammina, T. R. Connor, H. Seth-Smith, G. S. Vernikos, K. S. Robinson, M. Sanders, N. K. Petty, R. A. Kingsley, A. J. Baumler, S. P. Nuccio, I. Contreras, C. A. Santiviago, D. Maskell, P. Barrow, T. Humphrey, A. Nastasi, M. Roberts, G. Frankel, J. Parkhill, G. Dougan, and N. R. Thomson. 2011. *Salmonella bongori* provides insights into the evolution of the Salmonellae. *PLoS Pathog* 7 (8):e1002191.
- Francione, L., P. K. Smith, S. L. Accari, P. E. Taylor, P. B. Bokko, S. Bozzaro, P. L. Beech, and P. R. Fisher. 2009. *Legionella pneumophila* multiplication is enhanced by chronic AMPK signalling in mitochondrially diseased *Dictyostelium* cells. *Dis Model Mech* 2 (9-10):479-489.
- Fu, Y., and J. E. Galan. 1998. The *Salmonella typhimurium* tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton. *Mol Microbiol* 27 (2):359-368.
- Füllgrabe, J., D. J. Klionsky, and B. Joseph. 2014. The return of the nucleus: transcriptional and epigenetic control of autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15 (1):65-74.
- Furse, S., L. Mak, E. W. Tate, R. H. Templer, O. Ces, R. Woscholski, and P. R. Gaffney. 2015. Synthesis of unsaturated phosphatidylinositol 4-phosphates and the effects of substrate unsaturation on SopB phosphatase activity. *Org Biomol Chem* 13 (7):2001-2011.
- Gao, L. Y., O. S. Harb, and Y. Abu Kwaik. 1997. Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa. *Infect Immun* 65 (11):4738-4746.
- Garai, P., D. P. Gnanadhas, and D. Chakravorty. 2012. *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi as model organisms: revealing paradigm of host-pathogen interactions. *Virulence* 3 (4):377-388.
- Gaze, W. H., N. Burroughs, M. P. Gallagher, and E. M. Wellington. 2003. Interactions between *Salmonella typhimurium* and *Acanthamoeba polyphaga*, and observation

- of a new mode of intracellular growth within contractile vacuoles. *Microb Ecol* 46 (3):358-369.
- Godaly, G., B. Frendeus, A. Proudfoot, M. Svensson, P. Klemm, and C. Svanborg. 1998. Role of fimbriae-mediated adherence for neutrophil migration across *Escherichia coli*-infected epithelial cell layers. *Mol Microbiol* 30 (4):725-735.
- Gordon, M. A., H. T. Banda, M. Gondwe, S. B. Gordon, M. J. Boeree, A. L. Walsh, J. E. Corkill, C. A. Hart, C. F. Gilks, and M. E. Molyneux. 2002. Non-typhoidal *salmonella* bacteraemia among HIV-infected Malawian adults: high mortality and frequent recrudescence. *AIDS* 16 (12):1633-1641.
- Gutiérrez, M. G., S. S. Master, S. B. Singh, G. A. Taylor, M. I. Colombo, and V. Deretic. 2004. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* 119 (6):753-766.
- Hadwiger, J. A., and H. N. Nguyen. 2011. MAPKs in development: insights from *Dictyostelium* signaling pathways. *Biomol Concepts* 2 (1-2):39-46.
- Hansen-Wester, I., and M. Hensel. 2001. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect* 3 (7):549-559.
- Haraga, A., M. B. Ohlson, and S. I. Miller. 2008. Salmonellae interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol* 6 (1):53-66.
- Hardie, D. G., and M. L. Ashford. 2014. AMPK: regulating energy balance at the cellular and whole body levels. *Physiology (Bethesda)* 29 (2):99-107.
- Helgason, G. V., T. L. Holyoake, and K. M. Ryan. 2013. Role of autophagy in cancer prevention, development and therapy. *Essays Biochem* 55:133-151.
- Hernandez, L. D., M. Pypaert, R. A. Flavell, and J. E. Galan. 2003. A *Salmonella* protein causes macrophage cell death by inducing autophagy. *J Cell Biol* 163 (5):1123-1131.
- Hirao, A., and T. Hoshii. 2013. Mechanistic / mammalian target protein of rapamycin signaling in hematopoietic stem cells and leukemia. *Cancer Sci* 104 (8):977-982.
- Hoiseth, S. K., and B. A. Stocker. 1981. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291 (5812):238-239.
- Humphreys, D., P. J. Hume, and V. Koronakis. 2009. The *Salmonella* effector SptP dephosphorylates host AAA+ ATPase VCP to promote development of its intracellular replicative niche. *Cell Host Microbe* 5 (3):225-233.
- Inoki, K., T. Zhu, and K. L. Guan. 2003. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115 (5):577-590.

- Jaslow, S. L., K. D. Gibbs, W. F. Fricke, L. Wang, K. J. Pittman, M. K. Mammel, J. T. Thaden, V. G. Fowler, Jr., G. E. Hammer, J. R. Eifenbein, and D. C. Ko. 2018. Salmonella Activation of STAT3 Signaling by SarA Effector Promotes Intracellular Replication and Production of IL-10. *Cell Rep* 23 (12):3525-3536.
- Jia, K., C. Thomas, M. Akbar, Q. Sun, B. Adams-Huet, C. Gilpin, and B. Levine. 2009. Autophagy genes protect against *Salmonella typhimurium* infection and mediate insulin signaling-regulated pathogen resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (34):14564-14569.
- Jung, C. H., S. H. Ro, J. Cao, N. M. Otto, and D. H. Kim. 2010. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett* 584 (7):1287-1295.
- Kankwatira, A. M., G. A. Mwafulirwa, and M. A. Gordon. 2004. Non-typhoidal salmonella bacteraemia--an under-recognized feature of AIDS in African adults. *Trop Doct* 34 (4):198-200.
- Kaur, J., and J. Debnath. 2015. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16 (8):461-472.
- Klionsky, D. J., K. Abdelmohsen, A. Abe, M. J. Abedin, H. Abeliovich, A. Acevedo Arozena, H. Adachi, C. M. Adams, P. D. Adams, K. Adeli, P. J. Adhietty, S. G. Adler, G. Agam, R. Agarwal, M. K. Aghi, M. Agnello, P. Agostinis, P. V. Aguilar, J. Aguirre-Ghiso, E. M. Airoidi, S. Ait-Si-Ali, T. Akematsu, E. T. Akporiaye, M. Al-Rubeai, G. M. Albaiceta, C. Albanese, D. Albani, M. L. Albert, J. Aldudo, H. Algul, M. Alirezai, I. Alloza, A. Almasan, M. Almonte-Beceril, E. S. Alnemri, C. Alonso, N. Altan-Bonnet, D. C. Altieri, S. Álvarez, L. Álvarez-Erviti, S. Alves, G. Amadoro, A. Amano, C. Amantini, S. Ambrosio, I. Amelio, A. O. Amer, M. Amessou, A. Amon, Z. An, F. A. Anania, S. U. Andersen, U. P. Andley, C. K. Andreadi, N. Andrieu-Abadie, A. Anel, D. K. Ann, S. Anoopkumar-Dukie, M. Antonioli, H. Aoki, N. Apostolova, S. Aquila, K. Aquilano, K. Araki, E. Arama, et al., 2016. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12 (1):1-222.
- Knecht, D. A., S. M. Cohen, W. F. Loomis, and H. F. Lodish. 1986. Developmental regulation of *Dictyostelium discoideum* actin gene fusions carried on low-copy and high-copy transformation vectors. *Mol Cell Biol* 6 (11):3973-3983.
- Komalavilas, P., S. Mehta, C. J. Wingard, D. T. Dransfield, J. Bhalla, J. E. Woodrum, J. R. Molinaro, and C. M. Brophy. 2001. PI3-kinase/Akt modulates vascular smooth muscle tone via cAMP signaling pathways. *J Appl Physiol* (1985) 91 (4):1819-1827.
- Kreibich, S., M. Emmenlauer, J. Fredlund, P. Ramo, C. Munz, C. Dehio, J. Enninga, and W. D. Hardt. 2015. Autophagy Proteins Promote Repair of Endosomal Membranes Damaged by the Salmonella Type Three Secretion System 1. *Cell Host Microbe* 18 (5):527-537.

- Lau, N., A. L. Haeberle, B. J. O'Keeffe, E. A. Latomanski, J. Celli, H. J. Newton, and L. A. Knodler. 2019. SopF, a phosphoinositide binding effector, promotes the stability of the nascent *Salmonella*-containing vacuole. *PLoS Pathog* 15 (7):e1007959.
- Le Minor, L., M. Y. Popoff, B. Laurent, and D. Hermant. 1986. [Characterization of a 7th subspecies of *Salmonella*: *S. choleraesuis* subsp. *indica* subsp. nov.]. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 137B (2):211-217.
- Lee, I. H., L. Cao, R. Mostoslavsky, D. B. Lombard, J. Liu, N. E. Bruns, M. Tsokos, F. W. Alt, and T. Finkel. 2008. A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (9):3374-3379.
- Levine, B., and V. Deretic. 2007. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 7 (10):767-777.
- Levraud, J. P., M. Adam, M. F. Luciani, C. de Chastellier, R. L. Blanton, and P. Golstein. 2003. Dictyostelium cell death: early emergence and demise of highly polarized paddle cells. *J Cell Biol* 160 (7):1105-1114.
- Lin, S. L., T. X. Le, and D. S. Cowen. 2003. SptP, a *Salmonella* typhimurium type III-secreted protein, inhibits the mitogen-activated protein kinase pathway by inhibiting Raf activation. *Cell Microbiol* 5 (4):267-275.
- Lowe, D. C., T. C. Savidge, D. Pickard, L. Eckmann, M. F. Kagnoff, G. Dougan, and S. N. Chatfield. 1999. Characterization of candidate live oral *Salmonella* typhi vaccine strains harboring defined mutations in *aroA*, *aroC*, and *htrA*. *Infect Immun* 67 (2):700-707.
- Ly, T. M., and H. E. Muller. 1990. Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa. *J Med Microbiol* 33 (1):51-54.
- Majeski, A. E., and J. F. Dice. 2004. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36 (12):2435-2444.
- Mallo, G. V., M. Espina, A. C. Smith, M. R. Terebiznik, A. Aleman, B. B. Finlay, L. E. Rameh, S. Grinstein, and J. H. Brumell. 2008. SopB promotes phosphatidylinositol 3-phosphate formation on *Salmonella* vacuoles by recruiting Rab5 and Vps34. *J Cell Biol* 182 (4):741-752.
- Mansell, A., N. Khelef, P. Cossart, and L. A. O'Neill. 2001. Internalin B activates nuclear factor-kappa B via Ras, phosphoinositide 3-kinase, and Akt. *J Biol Chem* 276 (47):43597-43603.
- Marcus, S. L., M. R. Wenk, O. Steele-Mortimer, and B. B. Finlay. 2001. A synaptojanin-homologous region of *Salmonella* typhimurium SigD is essential for inositol phosphatase activity and Akt activation. *FEBS Lett* 494 (3):201-207.

- Marolda, C. L., B. Hauröder, M. A. John, R. Michel, and M. A. Valvano. 1999. Intracellular survival and saprophytic growth of isolates from the *Burkholderia cepacia* complex in free-living amoebae. *Microbiology* 145 (Pt 7):1509-1517.
- Massey, A. C., C. Zhang, and A. M. Cuervo. 2006. Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Curr Top Dev Biol* 73:205-235.
- Meili, R., C. Ellsworth, and R. A. Firtel. 2000. A novel Akt/PKB-related kinase is essential for morphogenesis in *Dictyostelium*. *Curr Biol* 10 (12):708-717.
- Mesquita, A., J. Calvo-Garrido, S. Carilla-Latorre, and R. Escalante. 2013. Monitoring autophagy in *Dictyostelium*. *Methods Mol Biol* 983:461-470.
- Mizushima, N., and D. J. Klionsky. 2007. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu Rev Nutr* 27:19-40.
- Mostowy, S. 2013. Autophagy and bacterial clearance: a not so clear picture. *Cell Microbiol* 15 (3):395-402.
- Murli, S., R. O. Watson, and J. E. Galan. 2001. Role of tyrosine kinases and the tyrosine phosphatase SptP in the interaction of *Salmonella* with host cells. *Cell Microbiol* 3 (12):795-810.
- Nguyen, H. N., B. Raisley, and J. A. Hadwiger. 2010. MAP kinases have different functions in *Dictyostelium* G protein-mediated signaling. *Cell Signal* 22 (5):836-847.
- Orvedahl, A., and B. Levine. 2009. Eating the enemy within: autophagy in infectious diseases. *Cell Death Differ* 16 (1):57-69.
- Otto, G. P., M. Y. Wu, N. Kazgan, O. R. Anderson, and R. H. Kessin. 2003. Macroautophagy is required for multicellular development of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* 278 (20):17636-17645.
- Owen, K. A., and J. E. Casanova. 2015. *Salmonella* Manipulates Autophagy to "Serve and Protect". *Cell Host Microbe* 18 (5):517-519.
- Paquette, M., L. El-Houjeiri, and A. Pause. 2018. mTOR Pathways in Cancer and Autophagy. *Cancers (Basel)* 10 (1):18.
- Patel, J. C., and J. E. Galán. 2006. Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. *J Cell Biol* 175 (3):453-463.
- Porwollik, S., and M. McClelland. 2003. Lateral gene transfer in *Salmonella*. *Microbes Infect* 5 (11):977-989.
- Ramos-Morales. 2012. Impact of *Salmonella enterica* Type III Secretion System Effectors on the Eukaryotic Host Cell. *ISRN Cell Biology* Article ID 787934.

- Reeves, M. W., G. M. Evins, A. A. Heiba, B. D. Plikaytis, and J. J. Farmer, 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. *J Clin Microbiol* 27 (2):313-320.
- Reh fuss, M. Y., C. T. Parker, and M. T. Brandl. 2011. *Salmonella* transcriptional signature in *Tetrahymena* phagosomes and role of acid tolerance in passage through the protist. *ISME J* 5 (2):262-273.
- Reynolds, M. M., L. Bogomolnaya, J. Guo, L. Aldrich, D. Bokhari, C. A. Santiviago, M. McClelland, and H. Andrews-Polymenis. 2011. Abrogation of the twin arginine transport system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium leads to colonization defects during infection. *PLoS One* 6 (1):e15800.
- Riquelme, S., M. Varas, C. Valenzuela, P. Velozo, N. Chahín, P. Aguilera, A. Sabag, B. Labra, S. A. Álvarez, F. P. Chavez, and C. A. Santiviago. 2016. Relevant Genes Linked to Virulence Are Required for *Salmonella* Typhimurium to Survive Intracellularly in the Social Amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Front Microbiol* 7:1305.
- Rodríguez-Escudero, I., N. L. Ferrer, R. Rotger, V. J. Cid, and M. Molina. 2011. Interaction of the *Salmonella* Typhimurium effector protein SopB with host cell Cdc42 is involved in intracellular replication. *Mol Microbiol* 80 (5):1220-1240.
- Rolhion, N., R. C. Furniss, G. Grabe, A. Ryan, M. Liu, S. A. Matthews, and D. W. Holden. 2016. Inhibition of Nuclear Transport of NF- κ B p65 by the *Salmonella* Type III Secretion System Effector SpvD. *PLoS Pathog* 12 (5):e1005653.
- Roppenser, B., H. Kwon, V. Canadien, R. Xu, P. N. Devreotes, S. Grinstein, and J. H. Brummell. 2013. Multiple host kinases contribute to Akt activation during *Salmonella* infection. *PLoS One* 8 (8):e71015.
- Rowbotham, T. J. 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* 33 (12):1179-1183.
- Ruan, H. H., Y. Li, X. X. Zhang, Q. Liu, H. Ren, K. S. Zhang, and H. Zhao. 2014. Identification of TRAF6 as a ubiquitin ligase engaged in the ubiquitination of SopB, a virulence effector protein secreted by *Salmonella typhimurium*. *Biochem Biophys Res Commun* 447 (1):172-177.
- Sabbagh, S. C., C. Lepage, M. McClelland, and F. Daigle. 2012. Selection of *Salmonella enterica* serovar Typhi genes involved during interaction with human macrophages by screening of a transposon mutant library. *PLoS One* 7 (5):e36643.
- Santiviago, C. A., M. M. Reynolds, S. Porwollik, S. H. Choi, F. Long, H. L. Andrews-Polymenis, and M. McClelland. 2009. Analysis of pools of targeted *Salmonella* deletion mutants identifies novel genes affecting fitness during competitive infection in mice. *PLoS Pathog* 5 (7):e1000477.

- Sauvonnet, N., I. Lambermont, P. van der Bruggen, and G. R. Cornelis. 2002. YopH prevents monocyte chemoattractant protein 1 expression in macrophages and T-cell proliferation through inactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Mol Microbiol* 45 (3):805-815.
- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J. Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, and A. Cardona. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9 (7):676-682.
- Schneider, C. A., W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9 (7):671-675.
- Segal, G., and H. A. Shuman. 1999. *Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages. *Infect Immun* 67 (5):2117-2124.
- Shahnazari, S., W. L. Yen, C. L. Birmingham, J. Shiu, A. Namolovan, Y. T. Zheng, K. Nakayama, D. J. Klionsky, and J. H. Brummel. 2010. A diacylglycerol-dependent signaling pathway contributes to regulation of antibacterial autophagy. *Cell Host Microbe* 8 (2):137-146.
- Sillo, A., J. Matthias, R. Konertz, S. Bozzaro, and L. Eichinger. 2011. *Salmonella typhimurium* is pathogenic for *Dictyostelium* cells and subverts the starvation response. *Cell Microbiol* 13 (11):1793-1811.
- Skriwan, C., M. Fajardo, S. Hagele, M. Horn, M. Wagner, R. Michel, G. Krohne, M. Schleicher, J. Hacker, and M. Steinert. 2002. Various bacterial pathogens and symbionts infect the amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Int J Med Microbiol* 291 (8):615-624.
- Steinert, M. 2011. Pathogen-host interactions in *Dictyostelium*, *Legionella*, *Mycobacterium* and other pathogens. *Semin Cell Dev Biol* 22 (1):70-76.
- Stocker, B. A., S. K. Hoiseth, and B. P. Smith. 1983. Aromatic-dependent "*Salmonella* sp." as live vaccine in mice and calves. *Dev Biol Stand* 53:47-54.
- Strassmann, J. E., and L. Shu. 2017. Ancient bacteria-amoeba relationships and pathogenic animal bacteria. *PLoS Biol* 15 (5):e2002460.
- Sun, H., W. Cai, X. Wang, Y. Liu, B. Hou, X. Zhu, and L. Qiu. 2017. Vaccaria hypaphorine alleviates lipopolysaccharide-induced inflammation via inactivation of NFkappaB and ERK pathways in Raw 264.7 cells. *BMC Complement Altern Med* 17 (1):120.
- Terebiznik, M. R., O. V. Vieira, S. L. Marcus, A. Slade, C. M. Yip, W. S. Trimble, T. Meyer, B. B. Finlay, and S. Grinstein. 2002. Elimination of host cell

- PtdIns(4,5)P(2) by bacterial SigD promotes membrane fission during invasion by *Salmonella*. *Nat Cell Biol* 4 (10):766-773.
- Tezcan-Merdol, D., M. Ljungstrom, J. Winiecka-Krusnell, E. Linder, L. Engstrand, and M. Rhen. 2004. Uptake and replication of *Salmonella enterica* in *Acanthamoeba rhysodes*. *Appl Environ Microbiol* 70 (6):3706-3714.
- Thurston, T. L., G. Ryzhakov, S. Bloor, N. von Muhlinen, and F. Randow. 2009. The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat Immunol* 10 (11):1215-1221.
- Thurston, T. L., M. P. Wandel, N. von Muhlinen, A. Foeglein, and F. Randow. 2012. Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* 482 (7385):414-418.
- Todde, V., M. Veenhuis, and I. J. van der Klei. 2009. Autophagy: principles and significance in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1792 (1):3-13.
- Tresse, E., C. Giusti, A. Kosta, M. F. Luciani, and P. Golstein. 2008. Autophagy and autophagic cell death in *Dictyostelium*. *Methods Enzymol* 451:343-358.
- Tumbarello, D. A., P. T. Manna, M. Allen, M. Bycroft, S. D. Arden, J. Kendrick-Jones, and F. Buss. 2015. The Autophagy Receptor TAX1BP1 and the Molecular Motor Myosin VI Are Required for Clearance of *Salmonella Typhimurium* by Autophagy. *PLoS Pathog* 11 (10):e1005174.
- Ugland, H., S. Naderi, A. Brech, P. Collas, and H. K. Blomhoff. 2011. cAMP induces autophagy via a novel pathway involving ERK, cyclin E and Beclin 1. *Autophagy* 7 (10):1199-1211.
- Urrutia, Í. M., J. A. Fuentes, L. M. Valenzuela, A. P. Ortega, A. A. Hidalgo, and G. C. Mora. 2014. *Salmonella Typhi shdA*: pseudogene or allelic variant? *Infect Genet Evol* 26:146-152.
- Urrutia, Í. M., A. Sabag, C. Valenzuela, B. Labra, S. A. Álvarez, and C. A. Santiviago. 2018. Contribution of the Twin-Arginine Translocation System to the Intracellular Survival of *Salmonella Typhimurium* in *Dictyostelium discoideum*. *Front Microbiol* 9:3001.
- Varas, M. A., S. Riquelme-Barrios, C. Valenzuela, A. E. Marcoleta, C. Berrios-Pasten, C. A. Santiviago, and F. P. Chavez. 2018. Inorganic Polyphosphate Is Essential for *Salmonella Typhimurium* Virulence and Survival in *Dictyostelium discoideum*. *Front Cell Infect Microbiol* 8:8.
- Virgin, H. W., and B. Levine. 2009. Autophagy genes in immunity. *Nat Immunol* 10 (5):461-470.

- Wang, J., M. W. Whiteman, H. Lian, G. Wang, A. Singh, D. Huang, and T. Denmark. 2009. A non-canonical MEK/ERK signaling pathway regulates autophagy via regulating Beclin 1. *J Biol Chem* 284 (32):21412-21424.
- Wild, P., H. Farhan, D. G. McEwan, S. Wagner, V. V. Rogov, N. R. Brady, B. Richter, J. Korac, O. Waidmann, C. Choudhary, V. Dotsch, D. Bumann, and I. Dikic. 2011. Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts *Salmonella* growth. *Science* 333 (6039):228-233.
- Wildschutte, H., and J. G. Lawrence. 2007. Differential *Salmonella* survival against communities of intestinal amoebae. *Microbiology* 153 (Pt 6):1781-1789.
- Wildschutte, H., D. M. Wolfe, A. Tamewitz, and J. G. Lawrence. 2004. Protozoan predation, diversifying selection, and the evolution of antigenic diversity in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (29):10644-10649.
- Xu, Y., P. Zhou, S. Cheng, Q. Lu, K. Nowak, A. K. Hopp, L. Li, X. Shi, Z. Zhou, W. Gao, D. Li, H. He, X. Liu, J. Ding, M. O. Hottiger, and F. Shao. 2019. A Bacterial Effector Reveals the V-ATPase-ATG16L1 Axis that Initiates Xenophagy. *Cell* 178 (3):552-566.
- Yang, Y., Y. Sun, J. Xu, K. Bao, M. Luo, X. Liu, and Y. Wang. 2018. Epithelial Cells Attenuate Toll-Like Receptor-Mediated Inflammatory Responses in Monocyte-Derived Macrophage-Like Cells to *Mycobacterium tuberculosis* by Modulating the PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway. *Mediators Inflamm* 2018:3685948.
- Yorimitsu, T., and D. J. Klionsky. 2005. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2:1542-1552.
- Yuk, J. M., T. Yoshimori, and E. K. Jo. 2012. Autophagy and bacterial infectious diseases. *Exp Mol Med* 44 (2):99-108.
- Zheng, Y. T., S. Shahnazari, A. Brech, T. Lamark, T. Johansen, and J. H. Brumell. 2009. The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway. *J Immunol* 183 (9):5909-5916.