

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



**“Construcción de plasmidios recombinantes para la expresión, purificación y evaluación de la actividad proteolítica *in vitro* del efector GtgE de *Salmonella Typhimurium* sobre la proteína Rab32A de *Dictyostelium discoideum*”**

Memoria para optar al título profesional de Bioquímica

**Carolina Paz Calquín Bahamondes**

**Directores de Memoria**

**Dr. Carlos Santiviago Cid**  
Depto. de Bioquímica y Biología Molecular  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
Universidad de Chile

**Dr. Carlos Blondel Buijuy**  
Instituto de Ciencias Biomédicas  
Facultad de Medicina  
Universidad Andrés Bello

Santiago, septiembre de 2024

*Esta Memoria de Título se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile y en el Laboratorio de Biología de la Infección del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Andrés Bello. El trabajo fue financiado mediante los proyectos FONDECYT 1171844 y 1212075 dirigidos por el Dr. Carlos A. Santiviago.*

## Productividad

**Carolina Calquín**, Andrea Avilés, Fernando Amaya, Sergio A. Álvarez y Carlos A. Santiviago. **Construcción de plasmidios recombinantes para expresar, purificar y evaluar la actividad proteolítica *in vitro* del efector GtgE de *Salmonella Typhimurium* sobre la proteína Rab32A de *Dictyostelium discoideum*.** XLV Congreso Chileno de Microbiología, 4 al 7 de diciembre, 2023, Pucón, Chile.

**Carolina Calquín**, Andrea Avilés, Fernando Amaya, Sofía Vega, Sergio A. Álvarez, Carlos Blondel y Carlos A. Santiviago. **Evaluación de la actividad proteolítica *in vitro* del efector cisteína proteasa GtgE de *Salmonella Typhimurium* sobre la GTPasa monomérica Rab32A de *Dictyostelium discoideum*.** II Jornadas de Investigación, Innovación, Postgrado y Educación Continua, 4 al 6 de septiembre, 2024, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

**Carolina Calquín**, Andrea Avilés, Fernando Amaya, Sofía Vega, Sergio A. Álvarez, Carlos Blondel y Carlos A. Santiviago. **Evaluación de la actividad proteolítica *in vitro* del efector GtgE de *Salmonella Typhimurium* sobre la proteína Rab32A de *Dictyostelium discoideum*.** XLVI Congreso Chileno de Microbiología, 3 al 6 de diciembre, 2024, Coquimbo, Chile.

## **Agradecimientos**

El largo camino recorrido durante todos estos años no hubiera sido lo mismo sin todos aquellos que fueron parte y me acompañaron en el proceso.

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia por todo el esfuerzo que han hecho para hacerme feliz y darme lo mejor. Gracias a mis padres por apoyarme desde un inicio con la decisión de estudiar Bioquímica, jamás me dejaron sola y me levantaron cada vez que me caí, se preocuparon hasta del más mínimo detalle para hacerme más llevadero este recorrido. Gracias a mi madre por levantarse cada mañana para regalarme con el desayuno e irme a dejar a la micro, a mi padre por preocuparse de que no me falte nada para pasar los fríos inviernos en la facultad y noches de estudio, ustedes saben lo orgullosa que estoy de ser su hija. Gracias a mi mami Lucy por ser mi segunda mamá, cuidarme durante toda la vida y aún más ahora de mayor, por desearme todos los días que me vaya bien en la universidad y estar orgullosa de mí. A mi hermana Camila por ser mi compañera de pieza y darme tantos momentos de risa en los que terminé llorando con dolor de estómago. Mencionar además al resto de mi familia que fueron parte de tantos momentos de distracción los fines de semana y estuvieron atentos a mis avances en la carrera.

Agradezco a mi gatita Blanquita, la Gorda, por ser mi más fiel compañera durante estos 7 años de carrera. Fueron incontables las noches en las que estudiamos hasta ver el amanecer, mientras yo estuviese despierta estudiando en el comedor, ella estaría acostada a mi lado acompañándome. Gracias por consolarme cuando lloraba de frustración o de pena, por esas siestas reponedoras después de una prueba, por ronronearme y calmar mis nervios en las noches de insomnio. Gracias por quedarte esperando en el sillón cada mañana en la que nos despedimos y recibirme con tanto cariño cada vez que volví de la universidad por la noche, destrozada. No eres una simple mascota, para mí eres mi alma gemela y el ser que más podré amar en toda la vida.

Gracias a la Negrita, la gatita de mi hermana, por hacerme reír tanto cada vez que peleaba con la Gorda, también a la Rusia, por darme el honor de elegirme para cuidar de ella y sus dos hijitas, la Gorda y la Negrita. Al Agustín por ser el perrito más largo y regalón, también por acompañarme en los paseos por la cuadra para distraerme.

Gracias a todos los amigos que me acompañaron durante tantos años de sufrimiento universitario. Gracias a la Jesu por ser mi primera amiga de la carrera, a mis Wapes

queridos por adoptarme aun cuando era una ermitaña que se había echado ramos y quedó atrás, gracias a Martín por las mejores vacaciones y salidas a la disco que pude tener, jamás olvidaré esos incontables carretes en la casa del Nico y cada momento de alegría que me dieron cuando ya no dábamos más, también gracias por aquella fiesta sorpresa por mi cumpleaños. Gracias a los Nutrias por recibirme en su grupo cuando tuve que atrasarme en una generación, al Nico y sus súper Excel para calcular las notas, pandemia no hubiera sido lo mismo sin las sesiones de estudio por Discord y los servers de Minecraft. Gracias a la sabandija del Mirko, donde quiera que estés, me diste los consejos exactos en el momento exacto. También gracias a mis compañeritos de los últimos momentos de carrera, Wenas pa *Vitis vinifera*: Safki, Gabi, Mysan, Negro, Rous, soportamos los peores momentos juntos y logramos nadar hasta el final de la malla de carrera que parecía infinita, la parte que personalmente considero la más dura: trabajar en nuestras tesis o memorias de título, son los mejores compañeros y amigos que pude tener.

Gracias a mis mejores amigos por estar ahí en los buenos y malos momentos. Al Mati por entenderme y darme palabras de apoyo hermosas siempre, por creer en mí y ser un amigo incondicional que siempre tenía algún consejo que me hizo sentido, por mandarme memes de gatitos y estar para mí en los momentos difíciles, las salidas a comer y las estudiaciones por Discord con mi playlist de reggaetón antiguo de fondo. A la Catita por ser la mejor alumna de pasantía, ahijada, compañera de trabajo y amiga, gracias por acompañarme prácticamente a diario en el desarrollo de este trabajo y darme una mejor perspectiva de tantas cosas, gracias por las incontables noches de trabajos por llamada, tu compañía fue fundamental para no perder la cordura durante este trabajo, eres la amiga más cómica que cualquier persona podría tener, también la más genia y ocupada, pero que nunca me dejó sola a pesar de todos los compromisos que tenía, mi amiga más real. Gracias a la Meli y la Perry, siempre tuvieron fe en mí, fueron uno de los mejores apoyos y fuente de memes durante los momentos de mayor delirio. Gracias al Darío por ser el mayor pináculo del humor y por cada abrazo que me dio cuando me puse a llorar por cualquier cosa. A mi Alonsi, gracias por ser mi ahijado y el mejor estudiante de práctica del que pude ser tutora, el laboratorio no hubiera sido lo mismo sin ti. A todos ustedes los llevo en mi corazón, gracias por cada sonrisa y llanto que pudimos compartir, cada uno dejó una marca imborrable.

Gracias a mis queridos compañeritos de piso, Cristian, Cayetana y Valentina, fueron muy importantes en todo este sufrimiento llamado trabajar 10 horas diarias y caminar destrozados al metro.

Gracias a las dos personas importantes que ya no están aquí, pero sé que me acompañaron siempre. A mi tío Jorge, el tío Coco, gracias por hacerme reír y cuidarme cuando era tan chiquitita. A mi abuela Mercedes, mi mami Menche, por ser uno de mis ejemplos a seguir, una mujer fuerte en todos los sentidos y a la vez la más dulce conmigo, gracias escucharme atentamente cuando te conté sobre mis logros, por estar orgullosa de mí y ser otra madre para mí, por todas las golosinas que me diste a escondidas de mis papás y recibirme cada verano en tu casa para comer papas fritas, ir a verte al cementerio después de las pruebas me dio fortaleza para poder seguir.

Gracias a los profesores Cliff y Sergio por recibirme en el Laboratorio de Microbiología cuando ni yo misma confiaba en mí, llegué en mi primera Unidad de Investigación y jamás me fui. También gracias a todos los integrantes del laboratorio, que aportaron tanto en conocimiento como en buenos momentos de carcajadas hasta llorar y salidas a comer. Mencionar también al Laboratorio de Biología de la Infección, gracias a todos los integrantes por recibirme durante mi práctica profesional y el desarrollo de este trabajo, particularmente al profesor Carlos Blondel y a Sebastián por apoyarme en darle pelea a las purificaciones de proteínas. Agregar a la profesora Cecilia, que también me apoyó durante mi primera práctica profesional y me ayudó a crecer profesionalmente en el desafío que fue trabajar por primera vez en un laboratorio fuera de mi facultad.

Una mención especial a The Cure por ser el soundtrack de la carrera, también las maratones de monos chinos (sobre todo TR) cuando ya no daba más de tanto estudio o trabajo y me permitieron llorar por problemas ajenos a esta memoria de título.

Lo más probable es que gran parte de mis neuronas estén desgastadas en este punto y haya olvidado nombrar a más personas, pero sepan que los llevo a todos en mi corazón y estaré profundamente agradecida por todo el cariño que recibí durante estos años (y espero seguir recibiendo), además de las risas y buenas salidas.

Mucho texto, por último he de decirles que ahora puedo dormir en paz con la Gorda, no molestar por favor.

*Dedicada a mi gata, Blanca, mi fiel compañera  
y alma gemela.*

*“El dolor y el sufrimiento son siempre inevitables  
para una gran inteligencia y un corazón profundo.  
Las personas realmente grandes, creo yo, deben  
sentir en este mundo una gran tristeza.”*

*Fiódor Dostoyevski*

## Índice de contenidos

<b>Productividad</b> .....	<b>III</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>IV</b>
<b>Índice de contenidos</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>X</b>
<b>Índice de tablas</b> .....	<b>X</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>XI</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>XIII</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>XV</b>
<b>1.- Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1 Generalidades sobre <i>Salmonella</i> .....	1
1.2 Ciclo infectivo de <i>Salmonella</i> .....	1
1.3 Mecanismos de patogenicidad de <i>Salmonella</i> .....	2
1.4 Contribución del efector GtgE a la supervivencia intracelular de <i>Salmonella</i> .....	3
1.5 Interacción de <i>Salmonella</i> Typhimurium con <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	5
<b>2.- Propósito del estudio / Objetivo general</b> .....	<b>8</b>
<b>3.- Objetivos específicos</b> .....	<b>8</b>
<b>4.- Materiales y métodos</b> .....	<b>9</b>
4.1.- Cepas y cultivos bacterianos .....	9
4.2.- Clonamiento de genes en el vector de expresión pSEVA254.....	9
4.2.1.- Extracción de DNA plasmidial .....	9
4.2.2.- Partidores .....	10
4.2.3.- Obtención de productos de PCR.....	10
4.2.4.- Doble digestión y ligación .....	12
4.2.5.- Transformación .....	12
4.3.- Análisis de expresión inducible de las proteínas GtgE-6xHis, GtgE <sup>H151A</sup> -6xHis y Rab32A 6xHis desde los plasmidios recombinantes .....	14
4.4.- Expresión y purificación de proteínas.....	15
4.5.- Ensayo de actividad proteolítica <i>in vitro</i> .....	18

<b>5.- Resultados .....</b>	<b>20</b>
5.1.- Clonamiento de <i>rab32A</i> , <i>gtgE</i> , y <i>gtgE<sup>H151A</sup></i> en el plasmidio pSEVA254 .....	20
5.2.- Expresión inducible de las proteínas Rab32A-6xHis, GtgE-6xHis y GtgE <sup>H151A</sup> -6xHis ..	24
5.3.- Evaluación de la solubilidad de las proteínas Rab32A-6xHis, GtgE-6xHis y GtgE <sup>H151A</sup> -6xHis en los lisados bacterianos .....	25
5.4.- Purificación de las proteínas Rab32A-6xHis, GtgE-6xHis y GtgE <sup>H151A</sup> -6xHis .....	28
5.5.- Ensayo de proteólisis <i>in vitro</i> de GtgE-6xHis y GtgE <sup>H151A</sup> -6xHis sobre Rab32A-6xHis .....	33
<b>6.- Discusión .....</b>	<b>35</b>
<b>7.- Conclusiones .....</b>	<b>40</b>
<b>8.- Referencias .....</b>	<b>41</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b>	Bloqueo de la vía endocítica causada por <i>Salmonella</i> Typhimurium en la célula hospedera.....	5
<b>Figura 2.</b>	Análisis de secuencia aminoacídica de proteínas Rab32 de distintos orígenes.....	6
<b>Figura 3.</b>	PCR de colonias obtenidas luego de la transformación de <i>E. coli</i> TOP10 con pSEVA254:: <i>rab32A</i> -6xHis.....	21
<b>Figura 4.</b>	PCR de colonias obtenidas luego de la transformación de <i>E. coli</i> TOP10 con pSEVA254:: <i>gtgE</i> -6xHis y pSEVA254:: <i>gtgE</i> <sup>H151A</sup> -6xHis.....	21
<b>Figura 5.</b>	Alineamiento de secuencias de DNA de plasmidios recombinantes con la secuencia del marco de lectura que codifica la proteína teórica correspondiente.....	23
<b>Figura 6.</b>	Expresión inducible de las proteínas GtgE-6xHis y GtgE <sup>H151A</sup> -6xHis de <i>S. Typhimurium</i> y Rab32A-6xHis de <i>D. discoideum</i> en <i>E. coli</i> TOP10.....	25
<b>Figura 7.</b>	Confirmación de la solubilidad de las proteínas GtgE-6xHis y GtgE <sup>H151A</sup> -6xHis de <i>S. Typhimurium</i> y Rab32A-6xHis de <i>D. discoideum</i> .....	27
<b>Figura 8.</b>	Purificación a baja escala de las proteínas GtgE-6xHis y GtgE <sup>H151A</sup> -6xHis de <i>S. Typhimurium</i> y Rab32A-6xHis de <i>D. discoideum</i> .....	29
<b>Figura 9.</b>	Obtención de las proteínas GtgE-6xHis y GtgE <sup>H151A</sup> -6xHis de <i>S. Typhimurium</i> y Rab32A-6xHis de <i>D. discoideum</i> mediante rondas sucesivas de purificación.....	31
<b>Figura 10.</b>	Intercambio de tampón y concentración de preparaciones de las proteínas GtgE-6xHis, GtgE <sup>H151A</sup> -6xHis y Rab32A-6xHis.....	32
<b>Figura 11.</b>	Ensayo de actividad proteolítica <i>in vitro</i> de GtgE-6xHis y GtgE <sup>H151A</sup> -6xHis de <i>S. Typhimurium</i> sobre la proteína Rab32A-6xHis de <i>D. discoideum</i> .....	34

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b>	Oligonucleótidos utilizados para el clonamiento de los marcos de lectura de <i>rab32A</i> , <i>gtgE</i> y <i>gtgE</i> <sup>H151A</sup> en el vector pSEVA254.....	10
<b>Tabla 2.</b>	Condiciones de amplificación de los marcos de lectura de <i>rab32A</i> , <i>gtgE</i> y <i>gtgE</i> <sup>H151A</sup> .....	11
<b>Tabla 3.</b>	Condiciones de amplificación para verificar el clonamiento de los marcos de lectura de <i>rab32A</i> , <i>gtgE</i> y <i>gtgE</i> <sup>H151A</sup> en el vector pSEVA254.....	13

## Abreviaturas

°C	Grados Celsius
µg/mL	Microgramos por mililitro
µL	Microlitros
µM	Micromolar
6xHis	Epítopo de 6 residuos de histidina
BLOC-3	Complejo 3 de proteínas asociadas a la biogénesis de organelos relacionados a lisosomas
BME	β-mercaptoetanol
BSA	Albúmina de suero bovino
DNA	Ácido desoxirribonucleico
g	Fuerza/aceleración gravitacional
g/L	Gramos por litro
GAP	Proteína activadora de GTPasas
GDP	Guanosina difosfato
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GTP	Guanosina trifosfato
HRP	Peroxidasa de rábano
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
Kan	Kanamicina
kDa	Kilodaltons
LB	Medio Luria Bertani
LRO	Organelos relacionados con lisosomas
mM	Milimolar
Ni-NTA	Resina de ácido nitrilotriacético cargada de níquel
OD <sub>600nm</sub>	Densidad óptica medida a 600 nanómetros
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
SCV	Vacuola contenedora de <i>Salmonella</i>
SDS-PAGE	Electroforesis en geles desnaturantes de poliacrilamida
SOC	<i>Super Optimal Broth</i> suplementado con glucosa
SPI	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i>

<b>T3SS-1</b>	Sistema de secreción de tipo 3 codificado en la isla de patogenicidad 1 de <i>Salmonella</i>
<b>T3SS-2</b>	Sistema de secreción de tipo 3 codificado en la isla de patogenicidad 2 de <i>Salmonella</i>
<b>TAE</b>	Tris-acetato-EDTA
<b>TBS-T</b>	Solución salina tamponada con Tris y suplementada con Tween 20
<b>V</b>	Voltios
<b>WB</b>	<i>Western blot</i>

## Resumen

GtgE es un efector proteico translocado por los sistemas de secreción de tipo III codificados en las islas de patogenicidad SPI-1 y SPI-2 de *Salmonella*. Este efector presenta actividad cisteína proteasa contra GTPasas monoméricas como Rab32 en células de mamífero. Rab32 es crucial para restringir el crecimiento de bacterias patógenas intracelulares y es reclutada hacia la “vacuola contenedora de *Salmonella*” (SCV), compartimiento donde la bacteria sobrevive dentro de la célula hospedera. La proteólisis de Rab32 por GtgE interfiere en su reclutamiento hacia la SCV, promoviendo la supervivencia intracelular de *Salmonella* en macrófagos.

Recientemente, nuestro grupo de investigación demostró que *Salmonella* Typhimurium necesita a GtgE para sobrevivir intracelularmente en un compartimiento similar a la SCV en la ameba *Dictyostelium discoideum*. Análisis bioinformáticos revelaron que el genoma de esta ameba codifica 4 proteínas Rab32 (Rab32A–D), las que poseen alta similitud aminoacídica con Rab32 de mamíferos y presentan la secuencia blanco reconocida por GtgE. Ensayos de expresión heteróloga en *Escherichia coli* indicaron que GtgE proteoliza a Rab32A, la única Rab32 de *D. discoideum* cuya expresión se ha comprobado experimentalmente.

En esta investigación, se generaron construcciones plasmidiales con el fin de expresar y purificar la GTPasa Rab32A de *D. discoideum*, el efector GtgE de *S. Typhimurium* y una variante de este efector sin actividad catalítica (GtgE<sup>H151A</sup>). Las tres proteínas de interés se obtuvieron como proteínas de fusión al epítipo 6xHis en una cepa comercial de *E. coli*. La expresión inducible y la producción soluble de cada proteína se evaluó mediante SDS-PAGE y *Western blot*. Posteriormente, las proteínas fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad usando una resina de ácido nitrilotriacético cargada de níquel

(Ni-NTA) y sus identidades fueron confirmadas mediante SDS-PAGE y *Western blot*. De esta forma, se obtuvieron fracciones altamente enriquecidas de los efectores GtgE y GtgE<sup>H151A</sup>, así como del blanco molecular Rab32A. Finalmente, se realizaron ensayos enzimáticos *in vitro* utilizando las proteínas purificadas para evaluar la actividad proteolítica de GtgE sobre Rab32A, analizando los productos de reacción mediante SDS-PAGE. Estos experimentos confirmaron la actividad proteolítica *in vitro* del efector GtgE de *S. Typhimurium* sobre la GTPasa monomérica Rab32A de *D. discoideum*.

## Abstract

### **Construction of recombinant plasmids for expression, purification and evaluation of *in vitro* proteolytic activity of *Salmonella* Typhimurium effector GtgE on *Dictyostelium discoideum* Rab32A protein**

GtgE is an effector translocated by the type III secretion systems encoded in the SPI-1 and SPI-2 pathogenicity islands of *Salmonella*. This effector exhibits cysteine protease activity against monomeric GTPases such as Rab32 in mammalian cells. Rab32 is crucial for restricting the growth of intracellular pathogenic bacteria and is recruited to the “*Salmonella*-containing vacuole” (SCV), the compartment where the bacteria survive inside the host cell. The proteolysis of Rab32 by GtgE interferes with its recruitment to the SCV, promoting the intracellular survival of *Salmonella* in macrophages.

Recently, our research group demonstrated that *Salmonella* Typhimurium requires GtgE to survive intracellularly in a SCV-like compartment in the amoeba *Dictyostelium discoideum*. Bioinformatic analyses revealed that the genome of this amoeba encodes 4 Rab32 proteins (Rab32A–D), which have high amino acid similarity to mammalian Rab32 and contain the target sequence recognized by GtgE. Heterologous expression assays in *Escherichia coli* indicated that GtgE proteolyzes Rab32A, the only Rab32 from *D. discoideum* whose expression has been experimentally verified.

In this study, recombinant plasmids were generated to express and purify the GTPase Rab32A from *D. discoideum*, the GtgE effector from *S. Typhimurium*, and a variant of this effector lacking its catalytic activity (GtgE<sup>H151A</sup>). All three proteins of interest were obtained as 6xHis-tagged fusion proteins in a commercial strain of *E. coli*. Inducible expression and soluble production of each protein were evaluated by SDS-PAGE and Western blot. Subsequently, the proteins were purified using affinity chromatography with a

nickel-charged nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) resin, and their identities were confirmed by SDS-PAGE and Western blot. Thus, highly enriched fractions of the effectors GtgE and GtgE<sup>H151A</sup>, as well as the molecular target Rab32A, were obtained. Finally, *in vitro* enzymatic assays were performed using the purified proteins to evaluate the proteolytic activity of GtgE on Rab32A, analyzing the reaction products by SDS-PAGE. These experiments confirmed the *in vitro* proteolytic activity of the *S. Typhimurium* effector GtgE on the monomeric GTPase Rab32A from *D. discoideum*.

## 1.- Introducción

### 1.1 Generalidades sobre *Salmonella*

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y está constituido por bacilos Gram negativo que poseen un metabolismo anaerobio facultativo y son patógenos intracelulares facultativos (Andino y Hanning, 2015). Este género incluye a dos especies, *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*, las cuales en su conjunto se subdividen en más de 2500 serotipos (Reeves *et al.*, 1989).

Luego de su transmisión por vía alimentaria, *Salmonella* es capaz de causar cuadros gastrointestinales, así como infecciones sistémicas graves que pueden derivar en la muerte del hospedero (Crump *et al.*, 2004).

Entre los distintos serovares de *Salmonella enterica* se pueden encontrar aquellos conocidos como generalistas, los cuales son capaces de infectar una amplia variedad de hospederos, incluyendo seres humanos, mamíferos, aves de corral y silvestres, algunos reptiles y ocasionalmente insectos (Teklemariam *et al.*, 2023). Particularmente, el serovar *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) puede infectar a un amplio rango de hospederos y en humanos es capaz de causar con una mayor frecuencia cuadros de gastroenteritis autolimitada denominada salmonelosis. Por esto, se lo define como un serovar no tofoideo (Hohmann, 2001).

### 1.2 Ciclo infectivo de *Salmonella*

La transmisión de *Salmonella* tanto en humanos como en mamíferos se da primordialmente a través de la vía fecal-oral, tras el consumo de agua o alimentos contaminados con heces de hospederos portadores del patógeno (Teklemariam *et al.*, 2023).

Dentro de los factores de riesgo para el desarrollo de la salmonelosis se incluye la edad del hospedero, alteración de su microbiota intestinal como resultado del uso de antimicrobianos o cirugías, aclorhidria, gastritis atrófica o cirugía gástrica previa y diabetes (Hohmann, 2001). En pacientes que se encuentren inmunodeprimidos, el cuadro diarreico puede verse agravado, pasando de ser autolimitado a una enfermedad sistémica (Hohmann, 2001).

Tras ingresar por vía oral, *Salmonella* transita por el estómago, siendo capaz de sobrevivir al ambiente ácido. Posteriormente, viaja por el tracto intestinal hasta el intestino delgado en donde debe atravesar el epitelio intestinal (Hume *et al.*, 2017; Giannella *et al.*, 1972). Para esto, es necesario que la bacteria se adhiera a la superficie de las células epiteliales y posteriormente utilice diversos factores de virulencia que promuevan y faciliten la invasión, para finalmente poder sobrevivir intracelularmente (Wiedemann *et al.*, 2015).

### **1.3 Mecanismos de patogenicidad de *Salmonella***

A pesar de que existen diversos mecanismos para evitar infecciones bacterianas en el hospedero, *Salmonella* ha desarrollado numerosas estrategias para evadir estas defensas. Un ejemplo de esto es la utilización de sistemas especializados de secreción de proteínas, que corresponden a factores de virulencia ampliamente estudiados. Gracias a estos sistemas, *Salmonella* es capaz de introducir distintas proteínas que promueven la colonización, supervivencia y reproducción de esta bacteria en las células del hospedero (Flannagan *et al.*, 2009).

En *Salmonella* se han descrito cuatro familias de sistemas especializados de secreción de proteínas que resultan fundamentales para la infección de este patógeno en el hospedero (Bao *et al.*, 2020). Particularmente, los sistemas de secreción de tipo III (T3SSs) corresponden a estructuras similares a “jeringas moleculares” que permiten la

translocación de proteínas efectoras (también llamadas “efectores”) hacia el citoplasma o los sistemas membranosos de la célula hospedera (Deng *et al.*, 2017).

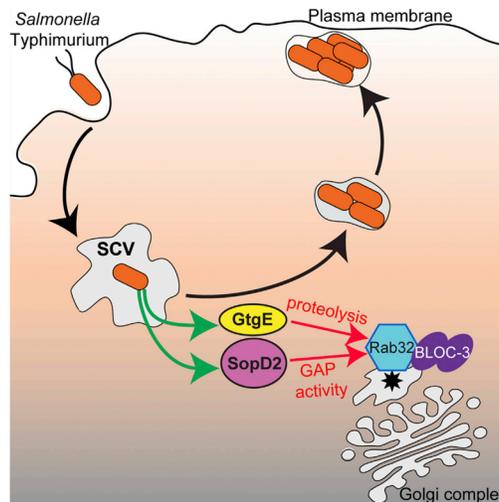
El genoma de *S. Typhimurium* posee agrupaciones de genes que codifican dos T3SSs distintos, los que se encuentran localizados dentro de las islas de patogenicidad SPI-1 y SPI-2 (T3SS-1 y T3SS-2, respectivamente) (Srikanth *et al.*, 2011). Durante la infección de células eucariontes no fagocíticas se expresan principalmente los genes que codifican el T3SS-1 y sus correspondientes efectores, lo que resulta fundamental para el proceso de invasión celular (Lou *et al.*, 2019). Por su parte, los genes que codifican el T3SS-2 son expresados principalmente cuando la bacteria se encuentra al interior de fagosomas en macrófagos y otras células eucariontes. En este caso, el T3SS-2 es requerido para la supervivencia intracelular del patógeno, ya que permite la translocación de efectores que toman control de la vía endocítica de la célula hospedera (Hensel *et al.*, 1995; Steele-Mortimer, 2008), impidiendo que el fagosoma se fusione a los lisosomas y permitiendo la generación de una “vacuola contenedora de *Salmonella*” (SCV). Dicha vacuola corresponde a un compartimiento membranoso modificado que permite la supervivencia y replicación intracelular del patógeno en el hospedero (Hernandez *et al.*, 2004; Liss *et al.*, 2017).

#### **1.4 Contribución del efector GtgE a la supervivencia intracelular de *Salmonella***

La proteína GtgE corresponde a un efector translocado al citoplasma de la célula hospedera mediante T3SS-1 y T3SS-2 (Spanò *et al.*, 2011). Esta proteína ha sido caracterizada como una cisteína proteasa que tiene como blancos moleculares a algunas GTPasas monoméricas eucariontes de la familia de las proteínas Rab, encargadas de los eventos de tráfico vesicular dentro del hospedero (Spanò & Galán, 2012; Bucci *et al.*, 2000).

En particular, Rab32 desempeña diversas funciones dentro de la célula, alguna de ellas relacionadas con la biogénesis de “organelos relacionados a lisosomas” (LRO), la autofagia, la dinámica mitocondrial y la regulación de la maduración de fagosomas durante la infección bacteriana (Savitskiy *et al.*, 2020). Para restringir el crecimiento de bacterias patógenas intracelulares como *S. Typhimurium*, Rab32 debe encontrarse en su estado activo (es decir, unida a GTP) por acción de factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF) como BLOC-3. Esto permite que la GTPasa pueda regular el tráfico vesicular a través de la unión de factores propios de la célula eucarionte hospedera, siendo reclutada a la SCV (Solano *et al.*, 2018; Tamura *et al.*, 2009).

Se ha descrito que la proteólisis de Rab32 por parte del efector GtgE evita que esta GTPasa sea reclutada hacia la SCV, interrumpiendo la vía endocítica y contribuyendo a la supervivencia intracelular del patógeno en macrófagos (Spanò *et al.*, 2016) (**Fig. 1**). Cabe destacar que GtgE interacciona con Rab32 cuando ésta se encuentra en su conformación inactiva (es decir, unida a GDP). Notablemente, además de GtgE, *S. Typhimurium* transloca el efector SopD2 (mediante su T3SS-2), una proteína que en su extremo C-terminal posee un dominio presente en proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAP) que interacciona con Rab32 para inactivarla estimulando la hidrólisis de GTP (Oke & D'Costa, 2024). Esto impide su reclutamiento hacia la SCV y a la vez posibilita que GtgE sea capaz de proteolizarla (Savitskiy & Itzen 2021; Wachtel *et al.*, 2018). Por otra parte, SopD2 también es capaz de interactuar e inactivar a Rab7, proteína que se asocia a fagosomas tardíos permitiendo la entrega de contenido endosomal a los lisosomas (Spanò *et al.*, 2016).



**Figura 1. Bloqueo de la vía endocítica causada por *Salmonella Typhimurium* en la célula hospedera.** Posterior a la invasión de la célula hospedera, *S. Typhimurium* reside en un compartimiento membranoso llamado “vacuola contenedora de *Salmonella*” (SCV). Desde aquí, los efectores GtgE y SopD2 son translocados hacia el citoplasma y son capaces de bloquear la vía endocítica dependiente de Rab32/BLOC-3. GtgE posee actividad proteolítica sobre Rab32 previamente inactivada por la actividad GAP de SopD2 (Spanò *et al.*, 2016).

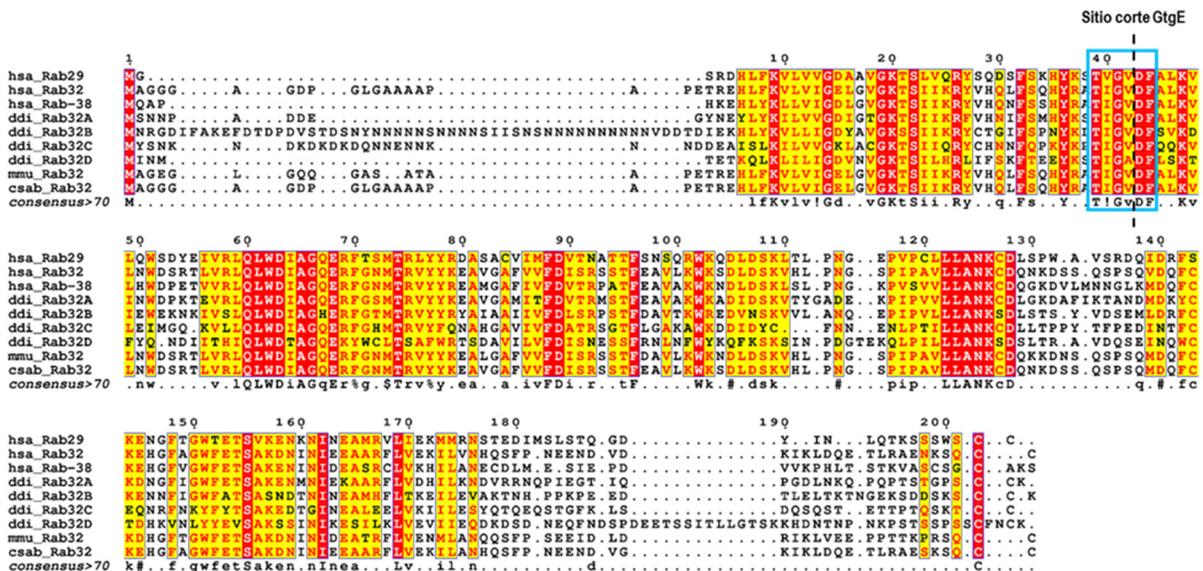
### 1.5 Interacción de *Salmonella Typhimurium* con *Dictyostelium discoideum*

*Dictyostelium discoideum* (*D. discoideum*) corresponde a una ameba social que habita suelos del bosque caducifolio y hojas en descomposición, alimentándose de bacterias y levaduras (Kessin, 2001). Estas amebas usan la fagocitosis como medio para la internalización de bacterias, capturando al microorganismo en fagosomas, y a través de la vía fagolisosomal, estas vacuolas son enviadas hacia el lisosoma, en donde su contenido es finalmente degradado por acción de diversas enzimas hidrolíticas (Bozzaro *et al.*, 2008).

Si bien *Salmonella* es un patógeno intracelular facultativo, pasa una parte considerable de su ciclo de vida en el ambiente, en donde comparte hábitat e interacciona con diversos protozoos. Hace un tiempo nuestro grupo reportó que *S. Typhimurium* es capaz de sobrevivir intracelularmente en *D. discoideum* y que para ello requiere distintos factores de virulencia, incluyendo a T3SS-1 y T3SS-2 (Riquelme *et al.*, 2016). Esto implica que el

patógeno utiliza efectores de estos sistemas para controlar procesos fisiológicos de la ameba que le permitan sobrevivir en ella.

En este contexto, nuestro grupo determinó recientemente que *S. Typhimurium* requiere del efector GtgE para sobrevivir intracelularmente dentro de una SCV en *D. discoideum* (datos no publicados). Considerando esto, nos propusimos determinar si esta ameba posee la GTPasa Rab32, que corresponde al principal blanco de GtgE. De esta forma, mediante análisis bioinformáticos identificamos 4 proteínas Rab32 (Rab32A–D) codificadas en el genoma de *D. discoideum*, las que comparten alta similitud aminoacídica con proteínas Rab32 de mamíferos (**Fig. 2**). Estas 4 proteínas presentan la secuencia T-I-V-G-V-A-D-F, que es reconocida por el efector GtgE en los blancos que proteoliza (**Fig. 2**).



**Figura 2. Análisis de secuencia aminoacídica de proteínas Rab32 de distintos orígenes.**

La secuencia aminoacídica de las 4 proteínas Rab32 (Rab32A–D) de *D. discoideum* (ddi) se alinearon contra las proteínas Rab29, Rab32 y Rab38 humanas (hsa), así como contra las proteínas Rab32 de ratón (mmu) y de *Chlorocebus sabaeus* (csab) o mono verde africano. En color celeste se enmarca la secuencia de residuos (T-I-V-G-V-A-D-F) experimentalmente definida para el corte proteolítico de GtgE en las proteínas Rab29, Rab32 y Rab38 de origen humano. El sitio específico de corte de GtgE es señalado como una línea discontinua de color negro. En la fila inferior se indican los aminoácidos consenso entre todas las proteínas. El alineamiento se realizó usando la plataforma *T-Coffee* en su modalidad *Expresso*. Se muestran bloques rojos cuando existe un 100% de conservación en dicha posición (100%) y bloques amarillos cuando existe al menos un 70% de conservación en dicha posición.

Cabe destacar que de las 4 proteínas mencionadas sólo se ha confirmado experimentalmente la expresión de Rab32A en *D. discoideum* (Boulais *et al.*, 2010). Para caracterizar el posible efecto de GtgE sobre Rab32A, realizamos ensayos de expresión heteróloga de ambas proteínas en *Escherichia coli*. Los resultados obtenidos confirmaron que GtgE es capaz de proteolizar a Rab32A bajo estas condiciones experimentales. A pesar de esto, pensamos que sería importante caracterizar la actividad de GtgE sobre Rab32A utilizando proteínas puras en un ensayo de proteólisis *in vitro*. Además, en estos ensayos se podría utilizar como control a la proteína GtgE<sup>H151A</sup>, una mutante catalítica del efector que no es capaz de proteolizar a Rab32 de células de mamífero y cuya inactividad fue previamente descrita y demostrada por Spanò *et al.* (2011). A futuro, la implementación del ensayo de proteólisis *in vitro* mencionado permitirá incorporar al efector SopD2 para evaluar su participación en este proceso.

## **2.- Propósito del estudio / Objetivo general**

Expresar y purificar las proteínas GtgE de *Salmonella* Typhimurium y Rab32A de *Dictyostelium discoideum*, para analizar la capacidad proteolítica *in vitro* del GtgE sobre Rab32A.

## **3.- Objetivos específicos**

Obj. Específico 1.- Construir plasmidios recombinantes para la expresión inducible del efector GtgE de *Salmonella* Typhimurium y la proteína Rab32A de *Dictyostelium discoideum*.

Obj. Específico 2.- Purificar el efector GtgE y la proteína Rab32A.

Obj. Específico 3.- Evaluar la actividad proteolítica *in vitro* del efector GtgE sobre la proteína Rab32A.

## **4.- Materiales y métodos**

### **4.1.- Cepas y cultivos bacterianos**

La cepa bacteriana TOP10 de *Escherichia coli* (Thermo Fisher Scientific) se utilizó para la construcción y mantención de plasmidios recombinantes, así como para la expresión inducible y posterior purificación de las proteínas recombinantes de interés. Las bacterias se crecieron rutinariamente con agitación (150 rpm) a 37°C en caldo Luria-Bertani (LB; 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 5g/L NaCl). Para solidificar el medio de cultivo, se suplementó con Bacto-Agar (15 g/L). Cuando fue requerido, el medio de cultivo se suplementó con kanamicina (Kan; 75 µg/mL) para la selección de bacterias transformantes.

### **4.2.- Clonamiento de genes en el vector de expresión pSEVA254**

#### **4.2.1.- Extracción de DNA plasmidial**

El vector de expresión pSEVA254 se extrajo a partir de una cepa derivada de *E. coli* BL21 (previamente transformada con el plasmidio) mediante el uso del sistema comercial “*QIAprep Spin Miniprep kit*” (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este plasmidio posee un promotor inducible por isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) y un gen que codifica una proteína que otorga resistencia a kanamicina (Jahn *et al.*, 2016). El plasmidio se extrajo a partir de un cultivo bacteriano en 5 mL de caldo LB suplementado con Kan 75 µg/mL, crecido durante toda la noche a 37°C con agitación. El DNA plasmidial se eluyó en 50 µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas a 65°C y luego se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% en tampón TAE 1x y tinción con una solución de GelRed (Biotium). La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 35 minutos. Finalmente, el plasmidio purificado se almacenó a 4°C hasta su uso posterior.

#### 4.2.2.- Partidores

En la **Tabla 1** se muestran los partidores utilizados para la obtención de productos de PCR necesarios para el clonamiento de los marcos de lectura de interés en el vector de expresión pSEVA254. También se muestran los partidores usados para confirmar la presencia de dichos marcos de lectura en los plasmidios recombinantes generados.

**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados para el clonamiento de los marcos de lectura de *rab32A*, *gtgE* y *gtgE<sub>H151A</sub>* en el vector pSEVA254.

Nombre	Secuencia
<i>gtgE_5'ORF_pSEVA</i>	GGAATTCTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTTAAGACACATTCAAATAG
3' <i>gtgE_6xHis_pSEVA</i>	GCTCTAGATCATAAAATGGTACACCAGTC
pSEVA_ <i>rab32A_5'ORF</i>	GGAATTCTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTCAAACAACCCAGCTG
pSEVA_ <i>rab32A_6xHis3'</i>	CTCTAGATTAATGGTGATGGTGATGATGACCAGAACCACCTTTACAACAACCTGGACCAG
pSEVA_Check_F	CTCCCGTTCTGGATAATGTT
pSEVA_Check_R	GAGACACAAATTTAAATCGTAATTA

#### 4.2.3.- Obtención de productos de PCR

A partir de derivados del vector de expresión pBAD-TOPO (Thermo Fisher Scientific) que contienen clonadas las fusiones génicas *rab32A-6xHis* y *gtgE-6xHis*, generados previamente en nuestro laboratorio, se amplificaron los marcos de lectura de *rab32A* y *gtgE* fusionados en el extremo 3' al epítipo 6xHis mediante PCR usando la DNA polimerasa de alta fidelidad *Phusion* (NEB) y las parejas de partidores pSEVA\_*rab32A\_5'ORF* / pSEVA\_*rab32A\_6xHis3'* o *gtgE\_5'ORF\_pSEVA* / 3'*gtgE\_6xHis\_pSEVA* (**Tabla 1**), respectivamente. Por su parte, a partir de un derivado del plasmidio pUC-GW-Kan que contiene clonado el marco de lectura de un gen que codifica una versión mutante de GtgE sin actividad catalítica (GtgE<sup>H151A</sup>), se amplificó el marco de lectura de *gtgE<sub>H151A</sub>* fusionado al epítipo 6xHis usando la pareja de partidores *gtgE\_5'ORF\_pSEVA* /

3'*gtgE*\_6xHis\_pSEVA (**Tabla 1**). El plasmidio derivado de pUC-GW-Kan se obtuvo a partir de un servicio de síntesis química realizado por la filial Genewiz ([www.genewiz.com](http://www.genewiz.com)) de la empresa Azenta Life Sciences ([www.azenta.com](http://www.azenta.com)).

Para el clonamiento de los marcos de lectura mencionados, los partidores usados para las amplificaciones (**Tabla 1**) permitieron incorporar sitios de restricción para las endonucleasas *EcoRI* y *XbaI* en el extremo 5' y 3' de los amplicones generados, respectivamente. Adicionalmente, los partidores que hibridan en los extremos 5' de cada marco de lectura permitieron incorporar un sitio de unión al ribosoma (TTAACTTTAAGAAGGAG) a las construcciones. Las reacciones de PCR se realizaron en las siguientes condiciones:

**Tabla 2.** Condiciones de amplificación de los marcos de lectura de *rab32A*, *gtgE* y *gtgE*<sub>H151A</sub>.

Mezcla de reacción			Programa de amplificación		
Reactivo	Volumen (µL)	Concentración	T°C	Tiempo (min:seg)	Ciclos
DNA	1	-	98	5:00	1
dNTPs 50x [10 mM cada uno]	1	0,2 mM	98	0:30	30
Partidor 5' [10 µM]	2,5	0,5 µM	55	0:30	
Partidor 3' [10 µM]	2,5	0,5 µM	72	1:00	
Tampón PCR <i>High Fidelity</i> 5x	10	1x	72	5:00	
DNA polimerasa <i>Phusion</i> (2 U/µL)	0,5	0,5 U/Rx	12	∞	-
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	32,5	-			
Volumen final	50				

Los amplicones fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% en tampón TAE 1x y tinción con una solución de GelRed (Biotium). La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 35 minutos.

Los productos de PCR fueron purificados mediante el sistema comercial "*QIAquick PCR Purification Kit*" (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada amplicón se eluyó en 50 µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas a 65°C y luego se almacenó a -20°C hasta su uso posterior.

#### **4.2.4.- Doble digestión y ligación**

Los amplicones que codificaban los marcos de lectura de interés se clonaron en el vector de expresión pSEVA254 (Martínez *et al.*, 2023), el cual contiene sitios de restricción para las endonucleasas *EcoRI* y *XbaI*. Para el clonamiento se realizó una doble digestión del vector de expresión y de los productos de amplificación purificados, utilizando las enzimas de restricción comerciales *FastDigest EcoRI* y *XbaI* (Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, durante 2 horas a 37°C. Los productos de digestión fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% en tampón TAE 1x y tinción con una solución de GelRed (Biotium). La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 35 minutos. Cada producto de digestión se purificó a partir del gel de agarosa mediante el sistema comercial “*QIAquick Gel Extraction Kit*” (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Finalmente, se ligó cada amplicón en el vector de expresión linealizado usando DNA ligasa del fago T4 (NEB) siguiendo las instrucciones del fabricante, durante toda la noche a temperatura ambiente.

#### **4.2.5.- Transformación**

Las mezclas de ligación fueron utilizadas para transformar bacterias *E. coli* TOP10 quimiocompetentes usando el sistema comercial “*One Shot™ TOP10 Chemically Competent E. coli*” (Thermo Fisher Scientific). Para esto, se agregaron 10 µL de cada ligación a un vial que contenía 50 µL de bacterias quimiocompetentes, para posteriormente incubar en hielo por 30 minutos. Finalmente, la transformación se produjo mediante un *shock* térmico a 42°C por 30 segundos, luego de lo cual se recuperaron las células durante 1 hora en 250 µL de medio SOC (Invitrogen) a 37°C con agitación a 150 rpm. Las bacterias transformadas fueron sembradas en placas de agar LB suplementado con Kan 75 µg/mL

para la selección de transformantes, de acuerdo con el marcador de resistencia presente en el plasmidio.

Para confirmar la presencia de los insertos de interés en los plasmidios recombinantes generados, se realizó PCR de colonias utilizando la pareja de partidores pSEVA\_Check\_F / pSEVA\_Check\_R, que flanquean el sitio de clonamiento en el vector, y las parejas de partidores pSEVA\_Check\_F / pSEVA\_rab32A\_6xHis3' o pSEVA\_Check\_F / 3'gtgE\_6xHis\_pSEVA" (Tabla 1), según el inserto. Como DNA molde, se usó una suspensión bacteriana de las colonias candidatas en 200 µL de H<sub>2</sub>O estéril y libre de nucleasas. Las reacciones de PCR se realizaron en las siguientes condiciones:

**Tabla 3.** Condiciones de amplificación para verificar el clonamiento de los marcos de lectura de *rab32A*, *gtgE* y *gtgE<sub>H151A</sub>* en el vector pSEVA254.

Mezcla de reacción			Programa de amplificación		
Reactivo	Volumen (µL)	Concentración	T°C	Tiempo (min:seg)	Ciclos
DNA	2	-	94	3:00	1
dNTPs 50x [10 mM cada uno]	0,4	0,2 µM	94	0:30	30
Partidor 1 [10 µM]	0,4	0,2 µM	55	0:30	
Partidor 2 [10 µM]	0,4	0,2 µM	72	2:00	
Tampón PCR 5x	4	1x	72	10:00	1
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	1,2	1,5 µM	4	∞	-
GoTaq DNA polimerasa (5 U/µL)	0,2	1 U/Rx			
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	11,4	-			
Total	20				

Una vez confirmada la presencia de los insertos de interés en los plasmidios recombinantes presentes en las colonias candidatas, se extrajo DNA plasmidial usando el sistema comercial "QIAprep Spin Miniprep kit" (Qiagen) a partir de un cultivo bacteriano en 5 mL de medio LB suplementado con Kan 75 µg/mL crecido durante toda la noche a 37°C con agitación a 150 rpm. Los plasmidios purificados se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% en tampón TAE 1x y tinción con una solución de GelRed (Biotium). La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 35 minutos. Finalmente, los

plasmidios recombinantes purificados se secuenciaron para confirmar la ausencia de mutaciones en los marcos de lectura clonados.

Paralelamente, se transformó la cepa comercial *E. coli Rosetta* (DE3) (Novagen) con el plasmidio recombinante generado tras el clonamiento del marco de lectura de *rab32A-6xHis* en el vector pSEVA254. Se confirmó la presencia del plasmidio recombinante en las bacterias transformantes seleccionadas en placas de agar LB suplementado con Kan 75 µg/mL mediante un PCR de colonias utilizando la pareja de partidores pSEVA\_Check\_F / pSEVA\_rab32A\_6xHis3' (**Tabla 1**), utilizando el programa de amplificación descrito en la **Tabla 3**.

#### **4.3 Análisis de expresión inducible de las proteínas GtgE-6xHis, GtgE<sup>H151A</sup>-6xHis y Rab32A-6xHis desde los plasmidios recombinantes**

A continuación, se buscó comprobar la expresión inducible de las proteínas GtgE-6xHis, GtgE<sup>H151A</sup>-6xHis y Rab23A-6xHis en *E. coli* TOP10, a partir de los plasmidios recombinantes generados. Para esto, se realizaron cultivos bacterianos en 5 mL de medio líquido LB suplementado con Kan 75 µg/mL realizando una dilución 1:100 de un preinóculo crecido durante toda la noche a 37°C con agitación. El cultivo se incubó hasta alcanzar una densidad óptica medida a 600 nm (OD<sub>600nm</sub>) de 0,6 y luego se indujo la expresión de las proteínas de interés con IPTG 1mM durante 1 hora. Por otra parte, se realizaron cultivos en paralelo bajo las mismas condiciones, pero suplementando el medio con L-glucosa 0,2% desde el inicio y sin agregar IPTG. En todos los casos, las células fueron recolectadas mediante centrifugación en tubos de fondo cónico a 6.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sedimento bacteriano fue resuspendido en tampón de lisis de Laemmli 1x suplementado con β-mercaptoetanol 10% (BME). La lisis bacteriana se realizó en un baño térmico, hirviendo las muestras a 100°C durante 10 minutos.

Las muestras (20  $\mu$ L de cada lisado bacteriano) fueron analizadas mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% de 1 mm de espesor. La corrida electroforética se realizó a 50 V durante 1 hora y luego a 100 V durante 2 horas o hasta que cayó el frente de corrida. Luego, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie durante toda la noche con agitación a 65 rpm. La destinción de los geles se realizó en una solución de ácido acético 7,5% y metanol 25% con agitación a 65 rpm.

Paralelamente, a partir de la electroforesis de las mismas muestras en un gel de poliacrilamida al 12% se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF durante 90 minutos a 300 mA. La membrana se bloqueó a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación a 65 rpm usando solución de bloqueo (TBS-T 0,1% suplementado con BSA 5%). Seguidamente, la membrana se incubó durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo primario contra el epítipo 6xHis (*IgG mouse* Abcam, ab18184) diluido 1:5.000 en la solución de bloqueo. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con agitación a 65 rpm usando solución TBS-T 0,1% y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación a 65 rpm con un anticuerpo secundario (*Goat anti-mouse IgG HRP*, Invitrogen #31430) diluido 1:10.000 en solución de bloqueo. Se realizó un último lavado en las condiciones mencionadas y se reveló la membrana con el reactivo comercial *SuperSignal™ West Femto* (Thermo Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante. Finalmente, se utilizó un sistema de fotodocumentación G:BOX Chemi XX6 (Syngene) para la captura de la señal quimioluminiscente.

#### **4.4 Expresión y purificación de proteínas**

La expresión de GtgE-6xHis, GtgE<sup>H151A</sup>-6xHis y Rab23A-6xHis en *E. coli* TOP10 (Invitrogen) se realizó mediante crecimiento de las cepas bacterianas correspondientes a 37°C con agitación hasta una OD<sub>600nm</sub> de 0,6, para luego inducir con IPTG 1 mM durante

1 hora. Las células fueron recolectadas mediante centrifugación en tubos de fondo cónico a 5.000 x g durante 10 minutos a 4°C, resuspendidas en 1 mL de tampón de lisis (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8,0), suplementando la suspensión con un inhibidor de serina proteasas (PMSF 1mM). La suspensión fue sometida a lisis por ultrasonido usando un equipo sonicador Q800R (QSonica). La lisis se realizó durante 1 minuto en total, manteniendo las muestras en hielo y empleando pulsos de 20 segundos a una amplitud de 40%, con descansos de 20 segundos entre cada pulso.

Luego, desde los lisados celulares obtenidos se separó una alícuota de 100 µL con la finalidad de comparar posteriormente la presencia de las proteínas de interés en el lisado y en la fracción soluble del mismo. El resto del volumen obtenido desde la sonicación fue clarificado por centrifugación a 4°C durante 20 minutos a 15.000 rpm, para obtener la fracción soluble que contiene la proteína de interés.

La fracción soluble obtenida fue sometida en primer lugar a una purificación a baja escala mediante cromatografía por afinidad, utilizando una resina comercial de ácido nitrilotriacético cargada de níquel (Ni-NTA) (QiaGen). Para esto, se utilizaron 50 µL de resina previamente equilibrada con 200 µL de tampón de lavado (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8,0 y suplementado con 10 µM de GDP para el caso de Rab32A) y se mezcló con todo el volumen obtenido de la fracción soluble de las proteínas (aproximadamente 900 µL), incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se realizaron tres lavados con 500 µL de tampón de lavado (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8,0 y suplementado con 10 µM de GDP para el caso de Rab32A) y posteriormente tres eluciones usando 50 µL de tampón de elución (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 8,0 y suplementado con 10 µM de GDP para el caso de Rab32A). Durante los lavados y las eluciones, se realizaron centrifugaciones a 4°C durante 30 segundos a 5.000 rpm.

Las proteínas obtenidas en las 3 eluciones fueron analizadas mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% de 1 mm de espesor. La corrida electroforética se realizó a 50 V durante 1 hora y luego a 100 V durante 2 horas o hasta que cayó el frente de corrida. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie durante toda la noche con agitación a 65 rpm. La destinción de los geles se realizó en una solución de ácido acético 7,5% y metanol 25% con agitación a 65 rpm.

La identidad de las proteínas recombinantes purificadas se confirmó mediante *Western blot*. Para esto, a partir de la electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF durante 65 minutos a 260 mA. Luego, se bloqueó la membrana a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación a 65 rpm usando solución de bloqueo (TBS-T 0,1% suplementada con leche 5%). Seguidamente, la membrana se incubó durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo primario contra el epítipo 6xHis (*IgG mouse* Invitrogen MA1-21315) diluido 1:2.000 en solución de bloqueo. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con agitación a 65 rpm usando solución TBS-T 0,1% y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con a 65 rpm con un anticuerpo secundario (*Goat anti-mouse IgG HRP*, Invitrogen #31430) diluido 1:5.000 en solución de bloqueo. Se realizó un último lavado en las condiciones mencionadas y se reveló la membrana con el reactivo comercial *SuperSignal™ West Femto* (Thermo Scientific) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Finalmente, se utilizó un sistema de fotodocumentación C-DiGit (Li-Cor) para la captura de la señal quimioluminiscente.

La concentración total de proteína presente en cada muestra de proteínas purificadas se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el sistema comercial "*Pierce™ Bradford Plus Protein Assay Reagent*" (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, se realizaron lecturas de la

absorbancia a 495 nm de cada muestra en un lector de microplacas Synergy H1 Hybrid (Biotek).

#### **4.5 Ensayo de actividad proteolítica *in vitro***

##### **4.5.1.- Intercambio de tampón y concentración de proteínas**

Previo a los ensayos de proteólisis, se intercambió el tampón de las proteínas purificadas, eliminando el imidazol mediante el uso de columnas Amicon (Merck) que tenían un corte de peso molecular (MWCO; *Molecular Weight Cut-Off*) de 10 kDa. En el caso de las preparaciones de Rab32A, el volumen obtenido de proteínas eluidas se llevó a 1,5 mL con tampón de intercambio (HEPES 20 mM, NaCl 50 mM y DTT 1 mM, pH 7,5) suplementado con GDP 10  $\mu$ M y MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Por su parte, en el caso de las preparaciones de GtgE y GtgE<sup>H151A</sup> se realizó el mismo procedimiento, pero el tampón de intercambio se suplementó con BME 2 mM. Para el intercambio de tampón, en primer lugar se realizó una centrifugación a 7.000 x g durante 30 minutos en total a 4°C, deteniéndose cada 10 minutos para resuspender la solución retenida por la membrana. Este procedimiento se repitió nuevamente para asegurarse de eliminar completamente el imidazol presente en las preparaciones. El volumen final obtenido de cada preparación se recuperó en un tubo Eppendorf, se suplementó con glicerol hasta alcanzar una concentración final de 10% y se almacenó a -20°C hasta su uso posterior.

##### **4.5.2.- Ensayo de proteólisis *in vitro***

Para el ensayo de proteólisis *in vitro* se realizaron 2 mezclas de reacción diferentes. En la primera se incubaron 5  $\mu$ L de la preparación de Rab32A con 3  $\mu$ L de una dilución 1:100 de la preparación del efector GtgE. En la segunda preparación se incubaron 5  $\mu$ L de la preparación de Rab32A con 3  $\mu$ L de una dilución 1:100 de la preparación del efector sin

actividad catalítica GtgE<sup>H151A</sup>. En paralelo, se incubaron 5  $\mu$ L de la preparación de Rab32A en ausencia de GtgE o GtgE<sup>H151A</sup> como control.

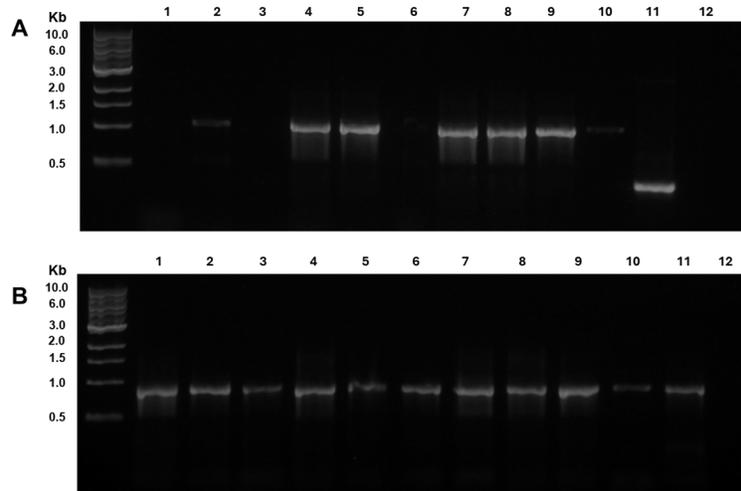
Las mezclas de reacción y el control se incubaron bajo cuatro condiciones distintas para determinar aquellas que permitieran visualizar la actividad proteolítica. De esta forma, se evaluó paralelamente distintos tiempos (30 minutos y 4 horas) y distintas temperaturas (25°C y 37°C) para la incubación. Todas las reacciones se realizaron en el tampón de intercambio mencionado en la **Sección 4.5.1**, suplementando además con MgCl<sub>2</sub> 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM y GDP 10  $\mu$ M.

Para detener las reacciones, se agregaron 5  $\mu$ L de tampón de lisis de Lamlli 4x y se calentaron las muestras a 100°C por 10 minutos. Finalmente, los productos de cada reacción fueron analizados mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% y posterior tinción con azul de Coomassie, como se describe en la **Sección 4.3.2**.

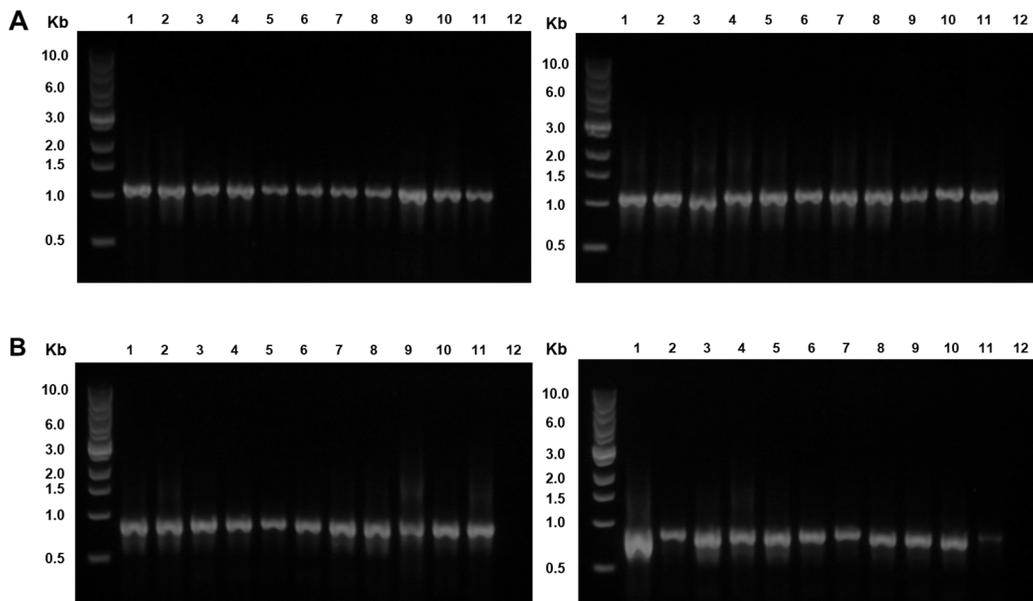
## 5.- Resultados

### 5.1 Clonamiento de *rab32A*, *gtgE* y *gtgE<sub>H151A</sub>* en el plasmidio pSEVA254

Para producir cepas de *E. coli* que pudieran expresar de manera recombinante las proteínas GtgE y GtgE<sup>H151A</sup> de *S. Typhimurium* y Rab32A de *D. discoideum*, se clonaron los marcos de lectura de los genes correspondientes en el vector de expresión pSEVA254, agregando en su extremo 3' la secuencia que codifica el epítipo 6xHis. Con el fin de verificar la correcta generación de las construcciones génicas, se realizaron amplificaciones mediante PCR de colonias a partir de muestras obtenidas desde colonias de bacterias seleccionadas aleatoriamente luego de la transformación con cada plasmidio recombinante. De esta forma, se corroboró finalmente que los marcos de lectura correspondientes a *rab32A*-6xHis (**Fig. 3**), *gtgE*-6xHis (**Fig. 4A**) y *gtgE<sub>H151A</sub>*-6xHis (**Fig. 4B**) se encontraban clonados en el vector de expresión y que los tamaños de los productos de PCR obtenidos coincidían con los valores teóricos esperados.



**Figura 3. PCR de colonias obtenidas luego de la transformación de *E. coli* TOP10 con pSEVA254::*rab32A-6xHis*.** Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de los productos de PCR obtenidos a partir de colonias seleccionadas en agar LB suplementado con Kan 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las amplificaciones se realizaron utilizando una pareja de partidores que flanquean el sitio de clonamiento del plasmidio pSEVA254 (tamaño esperado: 1.039 pb) (**A**) o la pareja de partidores que se usó durante el clonamiento del marco de lectura de *rab32A-6xHis* (tamaño esperado: 807 pb) (**B**). **A:** Carriles 1-10: templados de colonias seleccionadas, carril 11: control de amplificación usando el plasmidio vacío cerrado, carril 12: control negativo sin templado. **B:** Carriles 1-10: templados de colonias seleccionadas, carril 11: control de amplificación usando la mezcla de ligación, carril 12: control negativo sin templado.



**Figura 4. PCR de colonias obtenidas luego de la transformación de *E. coli* TOP10 con pSEVA254::*gtgE-6xHis* y pSEVA254::*gtgE<sub>H151A</sub>-6xHis*.** Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de los productos de PCR obtenidos a partir de colonias seleccionadas en agar LB suplementado con Kan 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las amplificaciones se realizaron utilizando una pareja de partidores que flanquean el sitio de clonamiento de *gtgE-6xHis* y *gtgE<sub>H151A</sub>-6xHis* en el plasmidio pSEVA254 (tamaño esperado: 1.113 pb) (**A**) o la pareja de partidores que se usó durante el clonamiento del marco de lectura de *gtgE-6xHis* y *gtgE<sub>H151A</sub>-6xHis* (tamaño esperado: 887 pb) (**B**). Carriles 1-10: templados de colonias seleccionadas, carril 11: control de amplificación usando la mezcla de ligación, carril 12: control negativo sin templado.

Para confirmar la ausencia de mutaciones que pudieron generarse durante el clonamiento de los marcos de lectura de interés en el vector de expresión, se realizó la secuenciación del DNA plasmidial. Para esto, se seleccionaron colonias que generaran amplicones específicos del tamaño esperado en el PCR de colonias para cada clonamiento. A partir de estas colonias, se extrajeron los plasmidios recombinantes y se analizaron mediante secuenciación usando los partidores pSEVA\_Check\_F y pSEVA\_Check\_R (**Tabla 1**), que hibridan en regiones que flanquean el sitio de clonamiento del vector pSEVA254. Las secuencias obtenidas fueron alineadas contra las secuencias teóricas de los marcos de lectura de *rab32A*-6xHis, *gtgE*-6xHis o *gtgE*<sub>H151A</sub>-6xHis, según correspondiera. De esta forma, en todos los casos fue posible confirmar que los plasmidios obtenidos desde las colonias seleccionadas no presentaban mutaciones en las secuencias clonadas (**Fig. 5**).

**A**

```
1 100
pSEVA254+gtgE-6xHis_Clon7 (1) TGAGCTGTTGACAAATTAATCATCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACCCCTAGGCCGCGGCGCGGAATCTTTGTTT
pSEVA254+gtgE (H151A)-6xHis_Clon1 (1) TGAGCTGTTGACAAATTAATCATCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACCCCTAGGCCGCGGCGCGGAATCTTTGTTT
(1) -----ATGTTAAGACACATCAAAATAGTTTAGGCAGCGTTTACAGAAGTAATACAGCAACTCCTCAGGGTCAGATTATTCA

101 200
pSEVA254+gtgE-6xHis_Clon7 (101) AACCTTAAAGAGGAGATATACATATGTTAAGACACATCAAAATAGTTTAGGCAGCGTTTACAGAAGTAATACAGCAACTCCTCAGGGTCAGATTATTCA
pSEVA254+gtgE (H151A)-6xHis_Clon1 (101) AACCTTAAAGAGGAGATATACATATGTTAAGACACATCAAAATAGTTTAGGCAGCGTTTACAGAAGTAATACAGCAACTCCTCAGGGTCAGATTATTCA
(1) -----ATGTTAAGACACATCAAAATAGTTTAGGCAGCGTTTACAGAAGTAATACAGCAACTCCTCAGGGTCAGATTATTCA

201 300
pSEVA254+gtgE-6xHis_Clon7 (201) CCATCGTAACTTTCAAAGCCAGTTTGTATACCACAGGCAACACCCCTCTACAATAAATGCTGGGTTTGTCTCAATTAATGTTATCAAAATCCAGAGATGGCAAT
pSEVA254+gtgE (H151A)-6xHis_Clon1 (201) CCATCGTAACTTTCAAAGCCAGTTTGTATACCACAGGCAACACCCCTCTACAATAAATGCTGGGTTTGTCTCAATTAATGTTATCAAAATCCAGAGATGGCAAT
(78) CCATCGTAACTTTCAAAGCCAGTTTGTATACCACAGGCAACACCCCTCTACAATAAATGCTGGGTTTGTCTCAATTAATGTTATCAAAATCCAGAGATGGCAAT

301 400
pSEVA254+gtgE-6xHis_Clon7 (301) AATTTATAGTGCAATTAGAGGACATCACTTCTGATAATCAAGCGTTTAAATAATATATTAGAGGTTATGATATAATAGAATGTGAGAATTTATTAAGAGAAA
pSEVA254+gtgE (H151A)-6xHis_Clon1 (301) AATTTATAGTGCAATTAGAGGACATCACTTCTGATAATCAAGCGTTTAAATAATATATTAGAGGTTATGATATAATAGAATGTGAGAATTTATTAAGAGAAA
(178) AATTTATAGTGCAATTAGAGGACATCACTTCTGATAATCAAGCGTTTAAATAATATATTAGAGGTTATGATATAATAGAATGTGAGAATTTATTAAGAGAAA

401 500
pSEVA254+gtgE-6xHis_Clon7 (401) TGAATGTGCAAAAATACCTGAATCCTCTCTTTTTCACAAACATTAAGAAGCTTTACAGGCAGAAAGTTTCAATAGTACTGTAGAAGATGACTTTGAGAG
pSEVA254+gtgE (H151A)-6xHis_Clon1 (401) TGAATGTGCAAAAATACCTGAATCCTCTCTTTTTCACAAACATTAAGAAGCTTTACAGGCAGAAAGTTTCAATAGTACTGTAGAAGATGACTTTGAGAG
(278) TGAATGTGCAAAAATACCTGAATCCTCTCTTTTTCACAAACATTAAGAAGCTTTACAGGCAGAAAGTTTCAATAGTACTGTAGAAGATGACTTTGAGAG

501 600
pSEVA254+gtgE-6xHis_Clon7 (501) TTTTATTTCTTACGAATTAACAAAACCATGGACCCTGATGTTGATCAGGCCCTTCACTTGGCTCGGAATGTCTACATGAGAGTGCATTGTAGGCTATGAT
pSEVA254+gtgE (H151A)-6xHis_Clon1 (501) TTTTATTTCTTACGAATTAACAAAACCATGGACCCTGATGTTGATCAGGCCCTTCACTTGGCTCGGAATGTCTACATGAGAGTGCATTGTAGGCTATGAT
(378) TTTTATTTCTTACGAATTAACAAAACCATGGACCCTGATGTTGATCAGGCCCTTCACTTGGCTCGGAATGTCTACATGAGAGTGCATTGTAGGCTATGAT

601 700
pSEVA254+gtgE-6xHis_Clon7 (601) AGTGAAGTGA AAAAGTATTAATTTATGATTCATGAATACCTCACCTGAATGGCAATCAAATATGATGCTATGACAAGCTTACCTTAGCATTCAATG
pSEVA254+gtgE (H151A)-6xHis_Clon1 (601) AGTGAAGTGA AAAAGTATTAATTTATGATTCATGAATACCTCACCTGAATGGCAATCAAATATGATGCTATGACAAGCTTACCTTAGCATTCAATG
(478) AGTGAAGTGA AAAAGTATTAATTTATGATTCATGAATACCTCACCTGAATGGCAATCAAATATGATGCTATGACAAGCTTACCTTAGCATTCAATG

701 800
pSEVA254+gtgE-6xHis_Clon7 (701) ATAAATATAAAAATGAAGATTGCGATTTTGTGGTCTTACTATGACGGTGTATTAGGCCAAAACCTTTACACTCCTCCTCTGGAAAGACTGGGTGAC
pSEVA254+gtgE (H151A)-6xHis_Clon1 (701) ATAAATATAAAAATGAAGATTGCGATTTTGTGGTCTTACTATGACGGTGTATTAGGCCAAAACCTTTACACTCCTCCTCTGGAAAGACTGGGTGAC
(578) ATAAATATAAAAATGAAGATTGCGATTTTGTGGTCTTACTATGACGGTGTATTAGGCCAAAACCTTTACACTCCTCCTCTGGAAAGACTGGGTGAC

801 900
pSEVA254+gtgE-6xHis_Clon7 (801) CATTTTAGTGGTCTGGTTCATCACCATCACCATGATCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCCGCGCTCGTACTGGGAAAACCTCTGG
pSEVA254+gtgE (H151A)-6xHis_Clon1 (801) CATTTTAGTGGTCTGGTTCATCACCATCACCATGATCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCCGCGCTCGTACTGGGAAAACCTCTGG
(678) CATTTTAGTGGTCTGGTTCATCACCATCACCATGATCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCCGCGCTCGTACTGGGAAAACCTCTGG

901 990
pSEVA254+gtgE-6xHis_Clon7 (901) CGACTAGTCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAATCCATCTGGATTGTTTCAAGACGCTCGGTTGCCGCGGGCGT
pSEVA254+gtgE (H151A)-6xHis_Clon1 (901) CGACTAGTCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAATCCATCTGGATTGTTTCAAGACGCTCGGTTGCCGCGGGCGT
(718) -----
```

**B**

```
1 100
pSEVA254+rab32A-6xHis_Clon8 (1) TGAGCTGTTGACAAATTAATCATCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACCCCTAGGCCGCGGCGCGGAATCTTTGTTT
rab23A-6xHis (1) -----ATGTTAAGACACATCAAAATAGTTTAGGCAGCGTTTACAGAAGTAATACAGCAACTCCTCAGGGTCAGATTATTCA

101 200
pSEVA254+rab32A-6xHis_Clon8 (101) AACCTTAAAGAGGAGATATACATATGTTAAGACACATCAAAATAGTTTAGGCAGCGTTTACAGAAGTAATACAGCAACTCCTCAGGGTCAGATTATTCA
rab23A-6xHis (1) -----ATGTTAAGACACATCAAAATAGTTTAGGCAGCGTTTACAGAAGTAATACAGCAACTCCTCAGGGTCAGATTATTCA

201 300
pSEVA254+rab32A-6xHis_Clon8 (201) TGGTAAAACCTCAATTTATTAAGAGATTGTTGCATAATATATCTCTATGCATTATAAATCAACCATTGGTGTAGATTTGGCAITAAAAGTGATTAATGG
rab23A-6xHis (78) TGGTAAAACCTCAATTTATTAAGAGATTGTTGCATAATATATCTCTATGCATTATAAATCAACCATTGGTGTAGATTTGGCAITAAAAGTGATTAATGG

301 400
pSEVA254+rab32A-6xHis_Clon8 (301) GATCCAAAACCCGAAGTTAGATTACAATTTATGGGATATTGCAAGTCAAGAAAGATTGGATCAATGACAGAGTTTATTAAGAAGCAGTTGGAGCAA
rab23A-6xHis (178) GATCCAAAACCCGAAGTTAGATTACAATTTATGGGATATTGCAAGTCAAGAAAGATTGGATCAATGACAGAGTTTATTAAGAAGCAGTTGGAGCAA

401 500
pSEVA254+rab32A-6xHis_Clon8 (401) TGATTACATTTGATGTTACTAGAATGAGTACATTTGAAGCAGTGTCTAAATGGAAGCAGATATTGATTTCAAAGTAACTTATGTTGTCAGATGAAAACCC
rab23A-6xHis (278) TGATTACATTTGATGTTACTAGAATGAGTACATTTGAAGCAGTGTCTAAATGGAAGCAGATATTGATTTCAAAGTAACTTATGTTGTCAGATGAAAACCC

501 600
pSEVA254+rab32A-6xHis_Clon8 (501) AATCCAGTAGTTTTTATAGCAAAACAAATGTGATTTAGTAAAAGATGCATTCAAGACTGCAACGATATGGATAAATTTGTAAGATAATGGTTTC
rab23A-6xHis (378) AATCCAGTAGTTTTTATAGCAAAACAAATGTGATTTAGTAAAAGATGCATTCAAGACTGCAACGATATGGATAAATTTGTAAGATAATGGTTTC

601 700
pSEVA254+rab32A-6xHis_Clon8 (601) ATTTGGTTGGTTCGAAACTAGTCTAAAGAAAATATGAATATTGAAAAGCAGCAGTTTCTTGGTGTATCATATCTTAAAGAATGATGTTAGAAGAAATC
rab23A-6xHis (478) ATTTGGTTGGTTCGAAACTAGTCTAAAGAAAATATGAATATTGAAAAGCAGCAGTTTCTTGGTGTATCATATCTTAAAGAATGATGTTAGAAGAAATC

701 800
pSEVA254+rab32A-6xHis_Clon8 (701) AACCAATTTGAAGTACAATTTCAACAGGCGATCTCAATAAACCAACCAACCAACTTCACTGGTCAAAGTTGTTGTAAGGTTGGTCTGGTCAATCA
rab23A-6xHis (578) AACCAATTTGAAGTACAATTTCAACAGGCGATCTCAATAAACCAACCAACCAACTTCACTGGTCAAAGTTGTTGTAAGGTTGGTCTGGTCAATCA

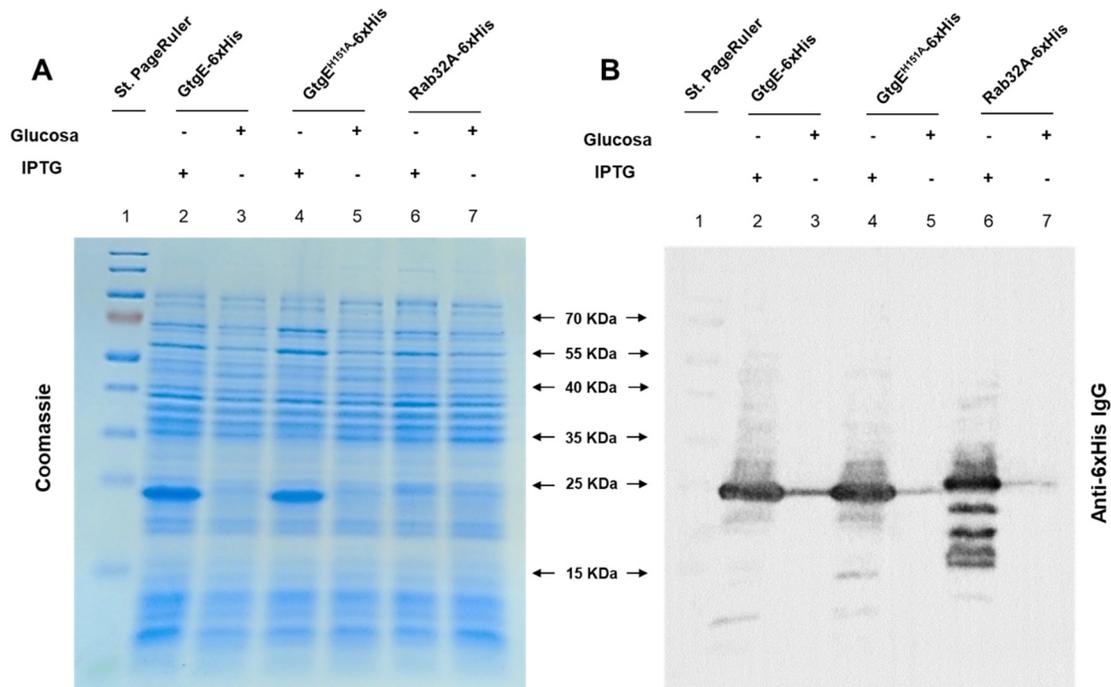
801 900
pSEVA254+rab32A-6xHis_Clon8 (801) CCATCACCATTAACTAGAGTGCACCTCGAGGATGCAAGCTTGGCCGCGCTGCTGACTGGGAAAACCTGGCGACTAGTCTTGGACTCTGTTGATAG
rab23A-6xHis (678) CCATCACCATTAA-----

901 963
pSEVA254+rab32A-6xHis_Clon8 (901) ATCCAGTAATGACCTCAGAATCCATCTGGATTGTTTCAAGACGCTCGGTTGCCGCGGGCGT
rab23A-6xHis (691) -----
```

**Figura 5. Alineamiento de secuencias de DNA de plasmidios recombinantes con la secuencia del marco de lectura que codifica la proteína teórica correspondiente. (A)** Secuenciación realizada con partidores externos al marco de lectura de *gtgE*-6xHis y *gtgE*<sub>H151A</sub>-6xHis. En rojo se muestra el marco de lectura de cada proteína, en negro las secuencias que flanquean al marco de lectura, destacado en celeste el codón de histidina del sitio catalítico de GtgE y su correspondiente reemplazo por alanina en la mutante catalítica. En azul se muestra la región que codifica al epítipo 6xHis. **(B)** Secuenciación realizada con partidores externos al marco de lectura de *rab32A*-6xHis. En rojo se muestra el marco de lectura de cada proteína, en negro las secuencias que flanquean al marco de lectura. En azul se muestra la región que codifica al epítipo 6xHis.

## 5.2 Expresión inducible de las proteínas Rab32A-6xHis, GtgE-6xHis y GtgE<sup>H151A</sup>-6xHis

A partir de las colonias transformantes previamente seleccionadas, se buscó verificar que la expresión de las proteínas recombinantes fuera efectivamente inducible por IPTG. Para ello, se realizaron cultivos bacterianos bajo condición de inducción con IPTG (1mM) o represión catabólica con L-glucosa (0,2%), de acuerdo con lo descrito en la **Sección 4.3.2** de Materiales y Métodos. En la **Fig. 7A** se muestra el análisis mediante SDS-PAGE de las muestras de los lisados bacterianos totales obtenidos a partir de los cultivos mencionados, donde se pueden observar bandas de mayor intensidad en los carriles correspondientes a los cultivos que fueron inducidos con IPTG en comparación a los cultivos crecidos en condiciones represoras. Estas bandas coinciden con los pesos moleculares teóricos de las proteínas recombinantes Rab32A-6xHis (25,79 kDa), GtgE-6xHis y GtgE<sup>H151A</sup>-6xHis (26,07 kDa). Por su parte, mediante la inmunodetección (**Fig. 7B**) fue posible confirmar que estas bandas corresponden a las proteínas que presentan el epítipo 6xHis, validando de esta forma la expresión inducible de todas las proteínas recombinantes.



**Figura 6. Expresión inducible de las proteínas GtgE-6xHis y GtgE<sup>H151A</sup>-6xHis de *S. Typhimurium* y Rab32A-6xHis de *D. discoideum* en *E. coli* TOP10.** Lisados bacterianos totales obtenidos desde un cultivo de *E. coli* TOP10 que expresa la proteína Rab32A de *D. discoideum*, el efector GtgE o la mutante catalítica GtgE<sup>H151A</sup> de *S. Typhimurium*, cada una fusionada al epítipo 6xHis en su extremo C-terminal. **(A)** Análisis mediante SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12% de las muestras obtenidas. Los gels se tiñeron con azul de Coomassie para la visualización de proteínas. **(B)** Inmunodetección mediante *Western blot* de las proteínas recombinantes resueltas mediante SDS-PAGE en el panel **(A)**, utilizando un anticuerpo primario específico contra el epítipo 6xHis. En ambos paneles **(A y B)**, los pesos moleculares de las bandas inducidas o inmunodetectadas se aproximan a los valores teóricos de GtgE-6xHis/GtgE<sup>H151A</sup>-6xHis (26,07 kDa, carriles 2-5) y Rab32A-6xHis (25,79 kDa, carriles 6 y 7).

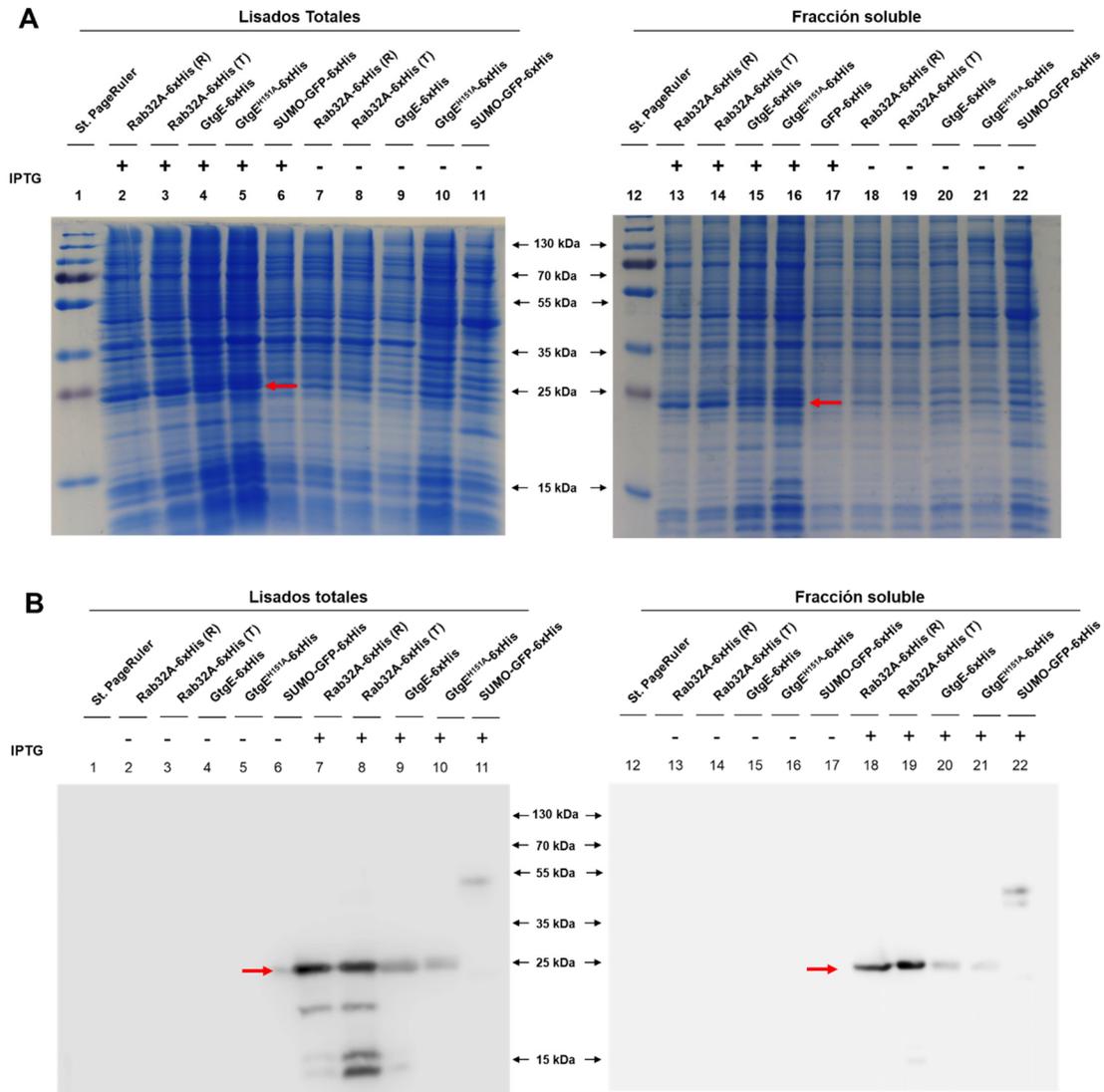
### 5.3 Evaluación de la solubilidad de las proteínas Rab32A-6xHis, GtgE-6xHis y GtgE<sup>H151A</sup>-6xHis en los lisados bacterianos

Se analizó la solubilidad de las proteínas recombinantes presentes en los lisados bacterianos mediante la generación de nuevos cultivos bacterianos en condiciones inductoras con IPTG, usando como condición control cultivos bacterianos crecidos en ausencia del inductor. Las muestras fueron procesadas como se describe en la **Sección 4.4** de Materiales y Métodos. Además, se agregó un control adicional correspondiente a una cepa derivada de *E. coli* BL21 que posee el plasmidio pCri-11b (Goulas *et al.*, 2014). Este plasmidio otorga resistencia a Kan y permite la expresión inducible de la proteína GFP

(*green fluorescent protein*) fusionada a un dominio SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) y al epítipo 6xHis en el extremo C-terminal de la fusión. El dominio SUMO permite aumentar la solubilidad de la proteína GFP (Guerrero *et al.*, 2015) y posibilita su uso como control de solubilidad de las proteínas en estudio. La cepa que portaba este plasmidio fue sometida a las mismas condiciones de cultivo usadas para las derivadas de *E. coli* TOP10 que portan los plasmidios recombinantes generados en este estudio.

Por otra parte, el plasmidio recombinante pSEVA254::*rab32A*-6xHis se transformó en la cepa comercial *E. coli* Rosetta (DE3), derivada de la cepa *E. coli* BL21. Esta bacteria permite una traducción más eficiente de marcos de lectura correspondientes a proteínas eucariontes, como es el caso de Rab32A.

Como se observa en la **Fig. 7A**, tanto en los lisados totales como en la fracción soluble es posible observar bandas de mayor intensidad en los carriles correspondientes a los cultivos inducidos con IPTG, cuyos pesos moleculares coinciden con los valores teóricos esperados para las proteínas en estudio, como para la proteína control GFP-SUMO-6xHis. Por otro lado, la inmunodetección mediante *Western blot* permitió confirmar la presencia de proteínas solubles en la fracción clarificada obtenida desde los lisados bacterianos totales de cultivos inducidos con IPTG. En la **Fig. 7B** se pueden observar bandas que coinciden con los tamaños teóricos esperados para GtgE-6xHis, GtgE<sup>H151A</sup>-6xHis y Rab32A-6xHis, al igual que el control positivo de GFP-SUMO-6xHis, confirmando que se encuentran en la fracción soluble.

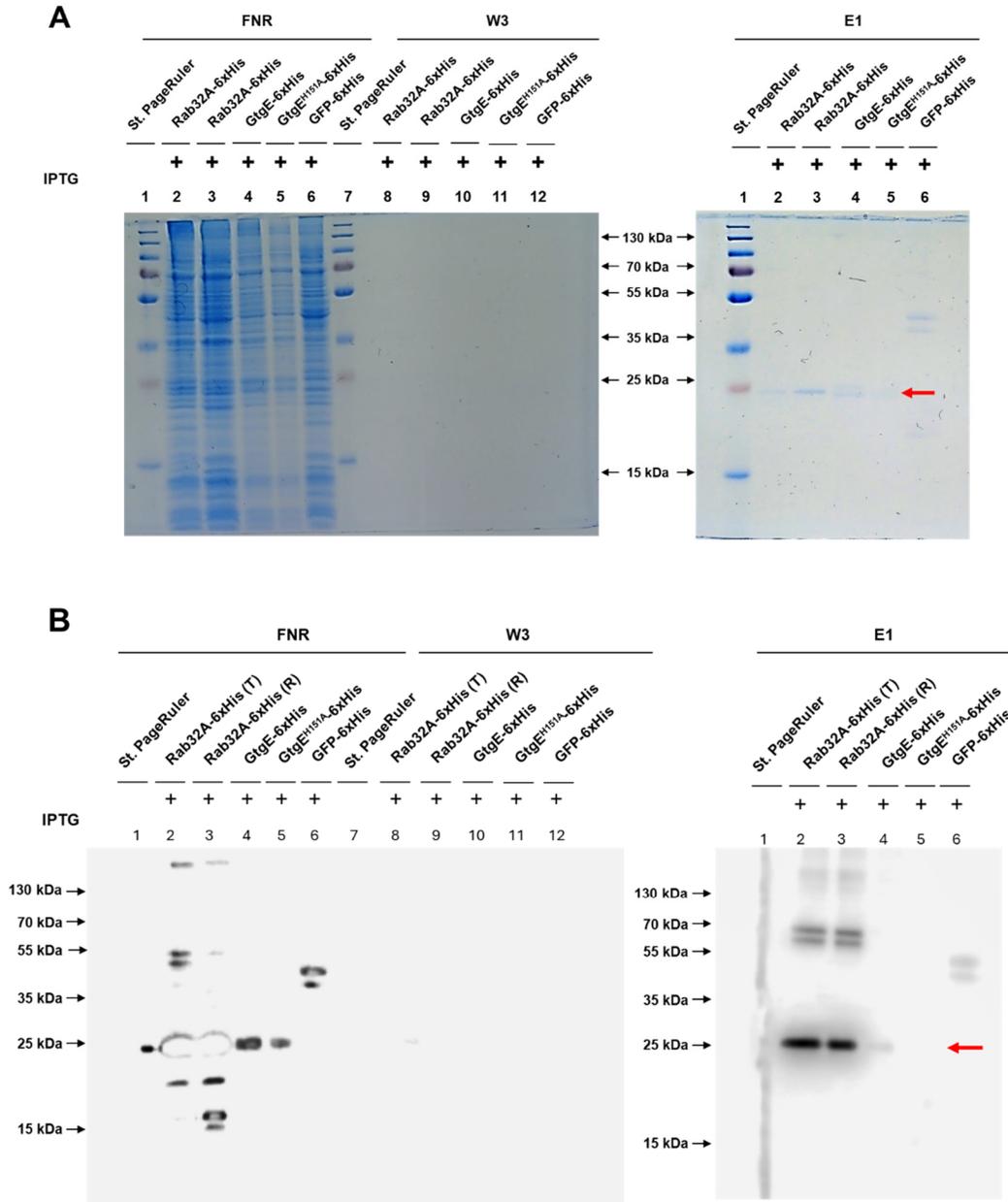


**Figura 7. Confirmación de la solubilidad de las proteínas GtgE-6xHis y GtgE<sup>H151A</sup>-6xHis de *S. Typhimurium* y Rab32A-6xHis de *D. discoideum*.** Lisados bacterianos totales y fracción soluble obtenidos desde un cultivo de *E. coli* TOP10 que expresa la proteína Rab32A de *D. discoideum*, el efector GtgE o la mutante catalítica GtgE<sup>H151A</sup> de *S. Typhimurium*, cada una fusionada al epítipo 6xHis en su extremo C-terminal. **(A)** Análisis mediante SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12% de las muestras obtenidas. Los gels se tiñeron con azul de Coomassie para la visualización de proteínas. **(B)** Inmunodetección mediante *Western blot* de las proteínas recombinantes resueltas mediante SDS-PAGE en el panel **(A)**, utilizando un anticuerpo primario específico contra el epítipo 6xHis. En ambos paneles **(A y B)**, los pesos moleculares de las bandas inducidas o inmunodetectadas se aproximan a los valores teóricos de GtgE-6xHis/GtgE<sup>H151A</sup>-6xHis (26,07 kDa), Rab32A-6xHis (25,79 kDa) (flechas rojas) y GFP-SUMO-6xHis (39,9 kDa). R: Rab32A-6xHis expresada en *E. coli* Rosetta (DE3). T: Rab32A-6xHis expresada en *E. coli* TOP10.

#### 5.4 Purificación de las proteínas Rab32A-6xHis, GtgE-6xHis y GtgE<sup>H151A</sup>-6xHis

Una vez confirmado que las proteínas recombinantes de interés estaban solubles en los lisados bacterianos, se decidió evaluar un esquema de purificación a baja escala de dichas proteínas mediante cromatografía de afinidad. A partir de cultivos bacterianos de 10 mL totales crecidos bajo las condiciones en las que se comprobó la inducción y la solubilidad de las proteínas recombinantes de interés, se realizó la purificación de las fracciones solubles de los lisados totales de cada cultivo utilizando una resina comercial de Ni-NTA. Distintas preparaciones obtenidas en cada paso de purificación, correspondientes a la fracción que no fue retenida por la resina (FNR), el tercer lavado de la resina (W3) y la primera elución de proteínas retenidas por la resina (E1), fueron analizadas mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% y posterior tinción con azul de Coomassie (**Fig. 8A**). Por otro lado, se realizó la transferencia de las proteínas de dichos geles a una membrana de PVDF y se realizó una inmunodetección de las proteínas recombinantes mediante *Western blot* usando un anticuerpo comercial anti-6xHis (**Fig. 8B**).

Como se observa en el análisis de las muestras mediante SDS-PAGE (**Fig. 8A**), en los carriles correspondientes al tercer lavado de la resina (W3) no es posible observar bandas de proteínas en el gel, por lo que la totalidad de las proteínas no retenidas fueron arrastradas en los lavados anteriores. Por otro lado, en los carriles correspondientes a la primera elución de proteínas retenidas en la resina (E1), es posible observar bandas únicas que presentan los tamaños esperados para cada una, cuya identidad fue confirmada mediante *Western blot* (**Fig. 8B**).



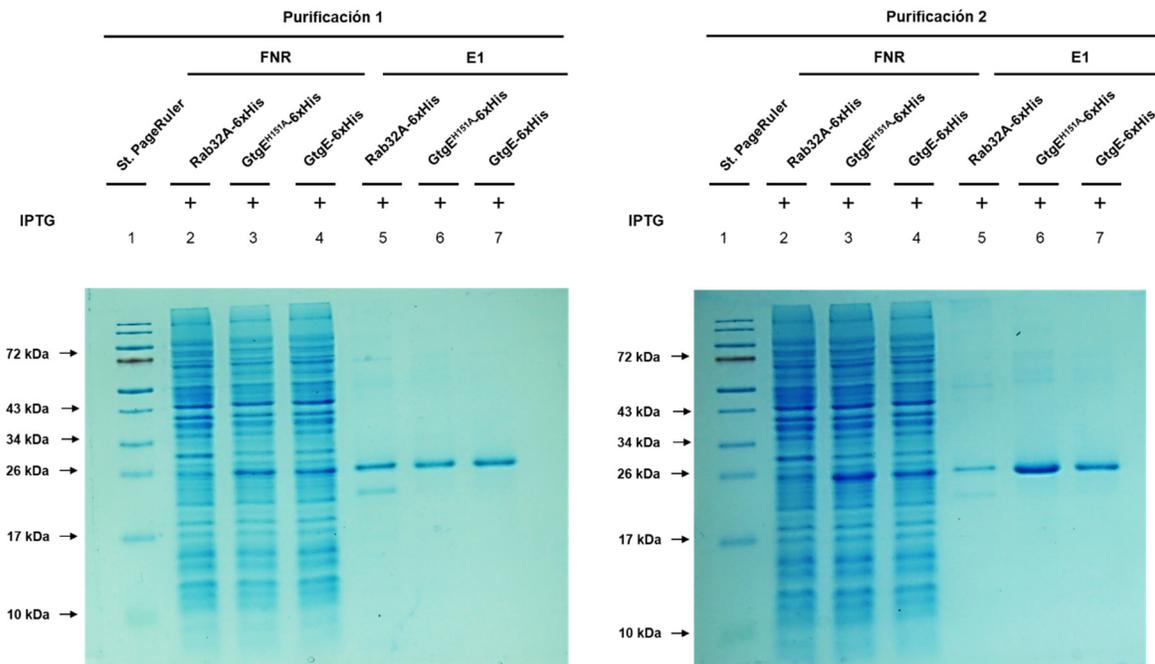
**Figura 8. Purificación a baja escala de las proteínas GtgE-6xHis y GtgE<sup>H151A</sup>-6xHis de *S. Typhimurium* y Rab32A-6xHis de *D. discoideum*.** Las muestras analizadas se obtuvieron a partir de la purificación con una resina Ni-NTA de proteínas presentes en lisados bacterianos clarificados provenientes de cultivos inducidos con IPTG. **(A)** SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12% y tinción de proteínas con azul de Coomassie de las muestras obtenidas desde la purificación con resina Ni-NTA. **(B)** Inmunodetección mediante *Western blot* de las proteínas recombinantes resueltas mediante SDS-PAGE en el panel (A), utilizando un anticuerpo primario específico contra el epítipo 6xHis. Fracción no retenida (FNR), tercer lavado (W3) y primera elución (E1) de Rab32A, GtgE, GtgE<sup>H151A</sup> y GFP-SUMO, cada una fusionada al epítipo 6xHis. En ambos paneles (A y B), los pesos moleculares de las bandas en el gel o inmunodetectadas se aproximan a los valores teóricos de GtgE-6xHis/GtgE<sup>H151A</sup>-6xHis (26,07 kDa), Rab32A-6xHis (25,79 kDa) (flechas rojas) y GFP-SUMO-6xHis (39,9 kDa). **R:** Rab32A-6xHis expresada en *E. coli* Rosetta (DE3). **T:** Rab32A-6xHis expresada en *E. coli* TOP10.

Durante el análisis mediante *Western blot* de las preparaciones de proteínas generadas durante el procedimiento de purificación (**Fig. 8B**) fue posible observar que en las muestras correspondientes a las fracciones no retenidas (FNR) se detectaban bandas que coinciden con los tamaños teóricos de las proteínas Rab32A-6xHis expresadas en ambas cepas de *E. coli*, así como de las proteínas GtgE-6xHis, GtgE<sup>H151A</sup>-6xHis y el control GFP-SUMO- 6xHis.

Considerando que la producción de Rab32A-6xHis en *E. coli Rosetta* (DE3) y *E. coli TOP10* no presentaba diferencias evidentes (**Fig. 7** y **Fig. 8**), de aquí en adelante se continuó usando esta última cepa para la expresión y purificación de dicha proteína.

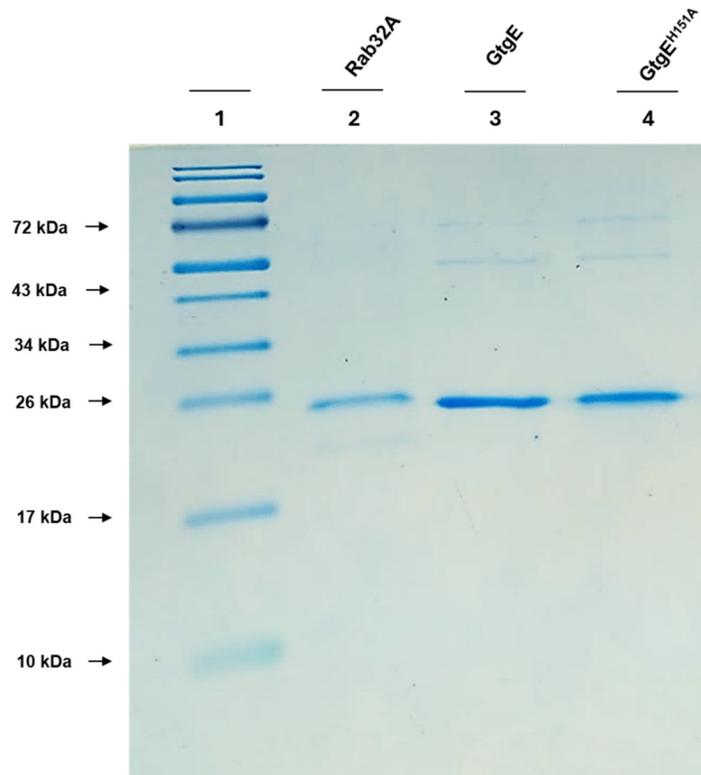
A continuación, decidimos comprobar si era posible obtener más proteína purificada que no estuviera siendo retenida en la resina. Para esto, a partir de un cultivo bacteriano en condiciones de inducción se realizaron dos rondas de purificación de proteínas consecutivas como se describe anteriormente (**Fig. 9**). Tanto para la primera como la segunda elución, se observaron bandas de proteínas purificadas cuyos pesos moleculares coinciden con los valores teóricos esperados. Sin embargo, en el caso de la segunda ronda de purificación también se observaron bandas adicionales (**Fig. 9**), las que probablemente correspondían a proteínas contaminantes que fueron retenidas por la resina, por lo cual no se realizó una tercera ronda de purificación a partir del mismo cultivo.

Por otro lado, las proteínas purificadas fueron cuantificadas mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) para corroborar que la cantidad de proteína purificada obtenida a partir del volumen de cultivo inducido no exceda la capacidad de captura de la alícuota utilizada de resina (50  $\mu$ L). Una vez verificado que era posible aumentar el volumen del cultivo utilizando la misma alícuota de resina, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se realizaron nuevos cultivos bacterianos en 100 mL de medio, los que fueron utilizados para purificar las proteínas de interés bajo las mismas condiciones descritas.



**Figura 9. Obtención de las proteínas GtgE-6xHis y GtgE<sup>H151A</sup>-6xHis de *S. Typhimurium* y Rab32A-6xHis de *D. discoideum* mediante rondas sucesivas de purificación.** SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12% y tinción de proteínas con azul de Coomassie de muestras obtenidas desde una primera ronda de purificación de proteínas recombinantes con resina Ni-NTA a partir de lisados clarificados obtenidos de un cultivo con inducción (IPTG 1mM) y una segunda purificación realizada a partir de la fracción no retenida que se obtuvo desde la primera purificación. **FNR**: fracción no retenida. **E1**: primera elución.

Para eliminar el imidazol presente en las preparaciones de proteínas, se realizó el intercambio de tampón utilizando columnas Amicon (Merck) con un MWCO de 10 kDa. Para esto, se combinaron las alícuotas de preparaciones de proteínas obtenidas luego de dos rondas de purificaciones en la resina de Ni-NTA y se pasaron a través de la columna Amicon, concentrándolas en un volumen menor (~100  $\mu$ L). Posteriormente, se analizaron las muestras obtenidas mediante SDS-PAGE y tinción de proteínas con azul de Coomassie para verificar que la alícuota rescatada desde la columna contenía la proteína de interés. En todos los casos analizados, se observaron bandas de proteínas que coinciden con los tamaños teóricos de GtgE-6xHis, GtgE<sup>H151A</sup>-6xHis y Rab32A-6xHis luego del paso de concentración usando columnas Amicon (**Fig. 10**).



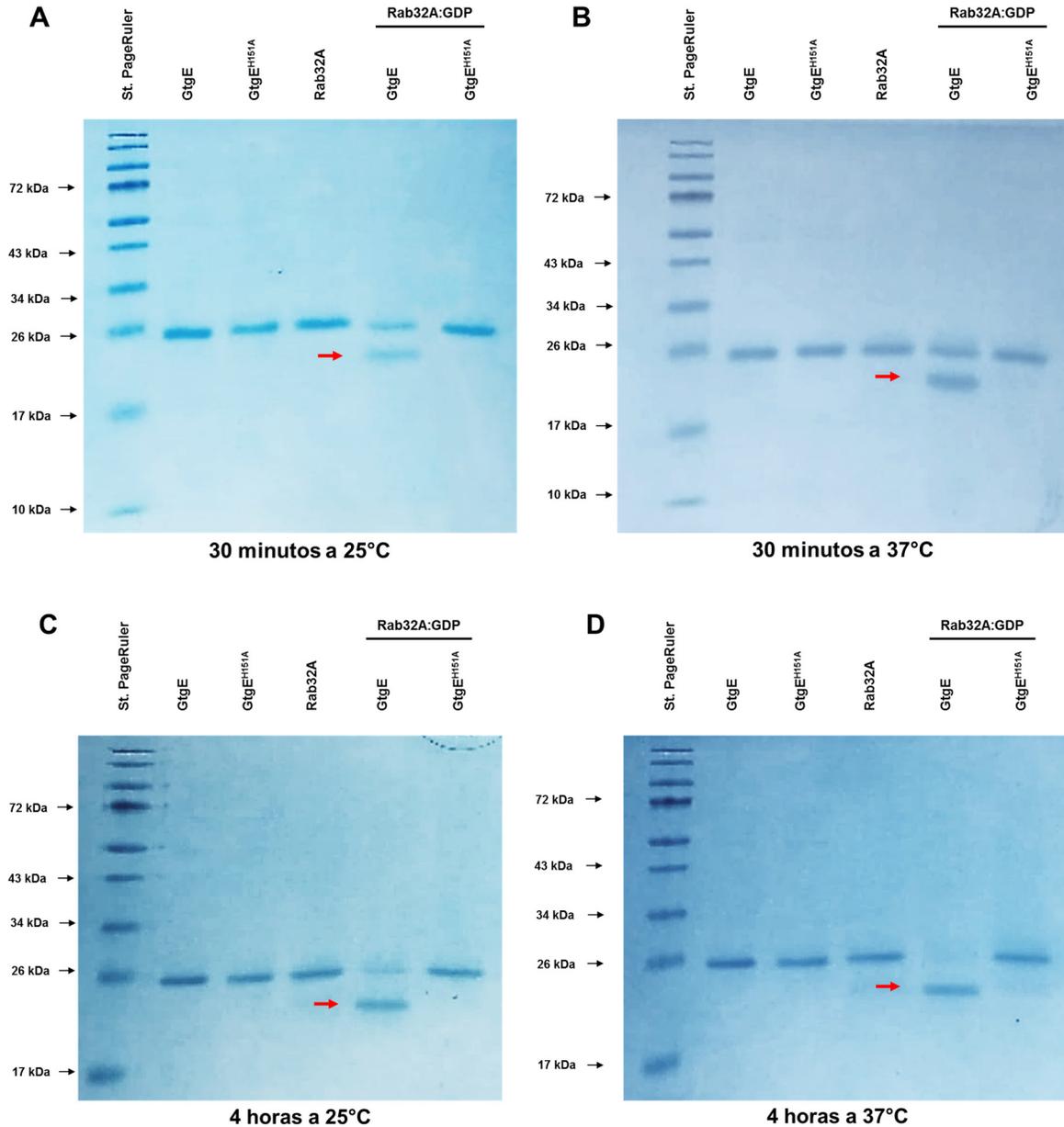
**Figura 10. Intercambio de tampón y concentración de preparaciones de las proteínas GtgE-6xHis, GtgE<sup>H151A</sup>-6xHis y Rab32A-6xHis.** SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% y tinción de proteínas con azul de Coomassie de muestras de las preparaciones de proteínas recombinantes obtenidas luego de intercambiar el tampón y concentrarlas usando columnas Amicon (MWCO = 10 kDa). Los pesos moleculares de las bandas obtenidas se aproximan a los valores teóricos de GtgE-6xHis/GtgE<sup>H151</sup>-6xHis (26,07 kDa) y Rab32A-6xHis (25,79 kDa).

## 5.5 Ensayo de proteólisis *in vitro* de GtgE-6xHis y GtgE<sup>H151A</sup>-6xHis sobre Rab32A-6xHis

Una vez obtenidas las proteínas recombinantes de interés mediante cromatografía de afinidad, se realizaron ensayos para evaluar la actividad proteolítica *in vitro* de GtgE-6xHis y GtgE<sup>H151A</sup>-6xHis sobre Rab32A-6xHis. Las reacciones se realizaron en el mismo tampón que se utilizó para el intercambio en columnas Amicon, suplementado además con CaCl<sub>2</sub> 10 mM y un exceso de GDP (10 μM). En las mezclas de reacción se incubó una muestra de la preparación de Rab32A-6xHis con una dilución 1/100 de la preparación de GtgE-6xHis o de GtgE<sup>H151A</sup>-6xHis. Como control, se incubó una muestra de Rab32A-6xHis en ausencia de GtgE-6xHis o GtgE<sup>H151A</sup>-6xHis. En todos los casos, las mezclas de reacción se incubaron a 25°C o a 37°C durante 30 minutos o 4 horas. Posteriormente, las reacciones fueron detenidas calentando las mezclas a 100°C en presencia de tampón de lisis de Laemmli 1x y luego analizadas mediante SDS-PAGE. Como referencia, en los geles se cargaron muestras sin diluir de las preparaciones de GtgE-6xHis y GtgE<sup>H151A</sup>-6xHis.

Como se observa en la **Fig. 11**, en los carriles correspondientes a la reacción enzimática con GtgE-6xHis se observa una banda de menor tamaño respecto del control de Rab32A-6xHis, la cual coincide con el tamaño teórico de uno de los fragmentos que se obtendría posterior al corte proteolítico de Rab32A-6xHis (~20 kDa). Transcurridos 30 minutos de reacción, tanto a 25°C como a 37°C, aún es posible observar de manera clara la banda correspondiente a la proteína Rab32A completa (**Fig. 11A y 11B**). Sin embargo, transcurridas 4 horas de reacción dicha banda desaparece casi por completo en ambas temperaturas (**Fig. 11C y 11D**). Cabe destacar que en las reacciones en las que se utilizó la proteína GtgE<sup>H151A</sup>-6xHis nunca se observó la presencia de la banda de ~20 kDa correspondiente al producto de proteólisis de Rab32A-6xHis (**Fig. 11**). De esta forma, nuestros ensayos *in vitro* permitieron confirmar que la cisteína proteasa GtgE de

*S. Typhimurium* es capaz de proteolizar a la GTPasa monomérica Rab32A de *D. discoideum* en las condiciones evaluadas.



**Figura 11. Ensayo de actividad proteolítica *in vitro* de GtgE-6xHis y GtgE<sup>H151A</sup>-6xHis de *S. Typhimurium* sobre la proteína Rab32A-6xHis de *D. discoideum*.** Mezclas de preparaciones de la proteína GtgE-6xHis o GtgE<sup>H151A</sup>-6xHis (diluidas 1/100) con la proteína Rab32A-6xHis previamente incubada en presencia de un exceso de GDP (10  $\mu$ M) se incubaron en cuatro condiciones: **(A)** durante 30 minutos a 25°C, **(B)** durante 30 minutos a 37°C, **(C)** durante 4 horas a 25°C y **(D)** durante 4 horas a 37°C. Las mezclas de reacción se analizaron mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% y tinción con azul de Coomassie. Las flechas rojas indican la presencia de una banda de ~20 kDa, correspondiente al producto de mayor tamaño generado a partir de la proteólisis de Rab32A-6xHis.

## 6.- Discusión

*Salmonella* es un patógeno intracelular facultativo (Andino & Hanning, 2015). Para poder sobrevivir y replicarse dentro de la célula hospedera, esta bacteria ha tenido que desarrollar una variedad de estrategias adaptativas (Flannagan *et al.*, 2009). Uno de los mecanismos más estudiados corresponde al uso de T3SSs para translocar proteínas efectoras hacia la célula hospedera (Deng *et al.*, 2017). A pesar de la presencia de diversos mecanismos antimicrobianos en el hospedero, *Salmonella* ha desarrollado numerosas estrategias para evadir estas defensas. Los sistemas de secreción son un ejemplo destacado de estas estrategias, actuando como factores de virulencia fundamentales y ampliamente estudiados. Gracias a estos sistemas, *Salmonella* puede introducir en el hospedero distintos efectores proteicos que promueven la colonización, supervivencia y reproducción de esta bacteria en el hospedero (Flannagan *et al.*, 2009).

Entre las proteínas efectoras secretadas a través de T3SSs se encuentra GtgE, la cual es translocada por los T3SS-1 y T3SS-2 de *S. Typhimurium* cuando la bacteria se encuentra dentro de la SCV. GtgE es una cisteína proteasa que actúa sobre Rab32, una proteína GTPasa monomérica que forma parte del mecanismo que restringe el crecimiento de patógenos intracelulares (Spanò & Galán, 2012), entre otras funciones. Este proceso de evasión de la vía degradativa endolisosomal en la célula hospedera ha sido estudiado en macrófagos murinos y humanos (Wachtel *et al.*, 2018). Estudios previos han demostrado que Rab32 es capaz de restringir la infección de *S. Typhi* en macrófagos murinos, pero que al infectar estos macrófagos con una cepa de *S. Typhi* que expresa el efector GtgE, el patógeno es capaz de sobrevivir intracelularmente (Spanò *et al.*, 2016; Spanò & Galán, 2012). A diferencia de *S. Typhi*, *S. Typhimurium* posee el gen que codifica el efector GtgE, permitiendo que este microorganismo utilice este mecanismo de defensa durante la

infección del hospedero (Savitskiy *et al.*, 2020). SopD2, efector secretado mediante el T3SS-2 de *S. Typhimurium*, corresponde a una proteína con actividad GAP que actúa de manera cooperativa con GtgE, contribuyendo a la patogénesis de *S. Typhimurium* en su ciclo infeccioso en mamíferos (Oke & D'Costa, 2024; Spanò *et al.*, 2016).

La ameba social *D. discoideum* es utilizada como organismo modelo para el estudio de la interacción entre protozoos y diversos patógenos, entre ellos *Salmonella* (Bozzaro *et al.*, 2008). Anteriormente, nuestro grupo había reportado que *S. Typhimurium* es capaz de sobrevivir intracelularmente en esta ameba (Riquelme *et al.*, 2016), requiriendo de múltiples factores de virulencia secretados mediante T3SS-1 y T3SS-2.

Más recientemente, nuestro grupo determinó que la delección de los genes que codifican los efectores GtgE y SopD2 en cepas de *S. Typhimurium* provocaba defectos en la supervivencia intracelular en *D. discoideum*, lo cual era revertido cuando dichos genes eran reincorporados en *trans* a las mutantes correspondientes.

En el genoma de *D. discoideum* se encuentran cuatro *loci* que codifican parálogos de la proteína Rab32 (Rab32A–D) (**Fig. 2**), de los cuales Rab32A muestra una gran similitud aminoacídica con la proteína Rab32 de origen humano, incluyendo el sitio de corte proteolítico específico para GtgE, el cual ha sido definido experimentalmente (Spanò & Galán, 2012).

Para evaluar si la GTPasa Rab32A es proteolizada por acción de GtgE, se co-expresaron heterológicamente en una cepa de *E. coli* ambas proteínas junto a la mutante catalítica GtgE<sup>H151A</sup> fusionadas al epítipo 6xHis, observándose que efectivamente Rab32A de *D. discoideum* es susceptible a la actividad proteolítica del efector GtgE de *S. Typhimurium*, al igual que se había reportado en mamíferos.

En mamíferos, GtgE es capaz de unirse con alta afinidad a Rab32 en su conformación inactiva (unida a GDP), pudiendo proteolizarla de manera eficiente (Wachtel *et al.*, 2018). Esto fue demostrado mediante ensayos de proteólisis *in vitro* utilizando el efector GtgE y el blanco Rab32 purificados a partir de su expresión heteróloga en *E. coli*, las que presentaban el epítipo His-MBP. Las purificaciones y la posterior eliminación de la etiqueta His-MBP se realizó mediante columnas de cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC). Para el caso de Rab32, posteriormente fue sometida a cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Por otra parte, Spanò *et al.* (2011) también expresaron heterológamente el efector GtgE fusionado al epítipo MBP, lo que permitió su purificación mediante cromatografía por afinidad usando una resina de amilosa.

En este estudio, se lograron expresar de manera recombinante en una cepa comercial de *E. coli* el efector GtgE-6xHis de *S. Typhimurium*, junto con su mutante catalítica GtgE<sup>H151A</sup>-6xHis, y la proteína blanco Rab32A-6xHis de *D. discoideum* (**Fig. 6**), pudiendo definir además las condiciones de cultivo que permiten la producción soluble de estas proteínas recombinantes (**Fig. 7**). Por otra parte, se comprobó que el epítipo 6xHis incorporado a estas proteínas en su extremo C-terminal se encontraba expuesto, permitiendo su inmunodetección mediante *Western blot*. La presencia de este epítipo en las proteínas recombinantes permitió su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad utilizando una resina comercial de Ni-NTA (**Fig. 8**). Para la purificación de las proteínas no se requirió el uso posterior de columnas de cromatografía IMAC o SEC, a diferencia de los trabajos de Wachtel *et al.* (2018) y Spanò *et al.* (2011). En nuestro caso, la resina Ni-NTA resultó eficiente para obtener las cantidades óptimas de proteínas purificadas sin necesitar de mayores volúmenes de cultivo.

GtgE fue capaz de proteolizar a Rab32 de macrófagos cuando se realizaron ensayos de proteólisis *in vitro* con las proteínas recombinantes purificadas (Wachtel *et al.*, 2018), lo

que permitió determinar los parámetros cinéticos de la reacción enzimática a 25°C, deteniendo el ensayo a distintos tiempos para analizar los productos mediante SDS-PAGE. En este caso, se pudo observar la aparición de productos de la proteólisis de Rab32 de manera progresiva en el tiempo (Wachtel *et al.*, 2018). Por su parte, Spanò *et al.* (2011) y Kohler *et al.* (2014) realizaron este mismo ensayo a partir de proteínas purificadas cambiando las condiciones de temperatura a 37°C y el tiempo de reacción a 30 minutos. Ellos observaron nuevamente mediante análisis de SDS-PAGE que GtgE producía el corte proteolítico sobre Rab32, obteniendo un producto de menor tamaño respecto de Rab32 en ausencia del efector. Basándonos en estos antecedentes, realizamos el ensayo de proteólisis *in vitro* a dos temperaturas diferentes (25°C y 37°C) y dos tiempos diferentes (30 minutos y 4 horas), lo que permitió evidenciar que la proteólisis ocurrió en todas las condiciones evaluadas. Estos resultados nos permitieron demostrar que el efector GtgE de *S. Typhimurium* posee actividad proteolítica sobre la GTPasa Rab32A de *D. discoideum* (**Fig. 11**). Si bien, es posible observar que la banda correspondiente al producto de proteólisis se hace más intensa cuando han transcurrido 4 horas de reacción (**Fig. 11C** y **11D**), no es posible establecer la cinética del proceso debido a que sólo evaluamos dos tiempos de reacción. Cabe mencionar que la actividad del efector no se vio afectada por la presencia del epítipo 6xHis, el cual no fue eliminado de la proteína posterior a la purificación de los efectores y el blanco molecular. En el trabajo de Wachtel *et al.* (2018) se utilizaron diluciones 1/100 y 1/1.000 de la concentración de GtgE respecto a la concentración de Rab32, demostrando que la actividad del efector resultaba eficiente aún en concentraciones bajas. Nosotros observamos algo similar, ya que en el caso de la proteólisis de Rab32A se usó una dilución 1/100 del volumen de GtgE respecto del volumen de Rab32A presente en la mezcla de reacción (**Fig. 11**).

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo resultan relevantes para profundizar en el entendimiento del mecanismo mediante el cual *S. Typhimurium* es capaz de sobrevivir intracelularmente en *D. discoideum* a través de la secreción de diversos factores de virulencia, como es el caso del efector GtgE, para evadir las defensas de este hospedero. Anteriormente sólo se había descrito la acción de esta proteína efectora en el contexto de la interacción de *S. Typhimurium* con macrófagos murinos y humanos. Estos resultados refuerzan y validan los hallazgos previos realizados por nuestro grupo de trabajo, proporcionando evidencia directa de la actividad proteolítica específica de GtgE sobre Rab32A.

Para complementar este estudio, se podría investigar el papel que cumple el efector SopD2 durante la proteólisis de Rab32A mediada por GtgE. La interacción funcional entre estos efectores facilita aún más la comprensión del proceso de manipulación del tráfico vesicular en *D. discoideum* por parte de *S. Typhimurium*. Actualmente, nuestro grupo se encuentra trabajando en la purificación de SopD2-6xHis, usando los protocolos desarrollados en este trabajo que permitieron la purificación exitosa de Rab32A-6xHis, GtgE-6xHis y GtgE<sup>H151A</sup>-6xHis. La purificación de SopD2-6xHis permitirá incluirla en ensayos de proteólisis *in vitro* como los que se desarrollaron en este estudio, para evaluar la función que cumple dicho efector en la inactivación de Rab32A y la necesidad de que esta GTPasa monomérica se encuentre unida a GDP para que se produzca la proteólisis por parte de GtgE.

## 7.- Conclusiones

- Se construyeron plasmidios recombinantes que permitieron la expresión inducible de los efectores GtgE y GtgE<sup>H151A</sup> de *S. Typhimurium* y la proteína Rab32A de *D. discoideum*.
- Las proteínas GtgE y GtgE<sup>H151A</sup> de *S. Typhimurium* y Rab32A de *D. discoideum* fueron purificadas como fusiones al epítipo 6xHis y se obtuvieron preparaciones concentradas de cada una.
- Mediante un ensayo *in vitro* confirmamos que el efector GtgE de *S. Typhimurium* posee actividad proteolítica sobre la proteína Rab32A de *D. discoideum*.

## 8.- Referencias

- **Andino, A., & Hanning, I.** (2015). *Salmonella enterica*: survival, colonization, and virulence differences among serovars. *The Scientific World Journal*, 2015, 520179. <https://doi.org/10.1155/2015/520179>
- **Bao, H., Wang, S., Zhao, J., & Liu, S.** (2020). *Salmonella* secretion systems: Differential roles in pathogen-host interactions. *Microbiological Research*, 241, 126591. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126591>
- **Boulais, J., Trost, M., Landry, C. R., Dieckmann, R., Levy, E. D., Soldati, T., Michnick, S. W., Thibault, P., & Desjardins, M.** (2010). Molecular characterization of the evolution of phagosomes. *Molecular Systems Biology*, 6, 423. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.80>
- **Bozzaro, S., Bucci, C., & Steinert, M.** (2008). Phagocytosis and host-pathogen interactions in *Dictyostelium* with a look at macrophages. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 271, 253–300. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(08\)01206-9](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)01206-9)
- **Bradford M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- **Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J., & van Deurs, B.** (2000). Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, 11(2), 467–480. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.2.467>
- **Crump, J. A., Luby, S. P., & Mintz, E. D.** (2004). The global burden of typhoid fever. *Bulletin of the World Health Organization*, 82(5), 346–353.
- **Deng, W., Marshall, N. C., Rowland, J. L., McCoy, J. M., Worrall, L. J., Santos, A. S., Strynadka, N., & Finlay, B. B.** (2017). Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nature Reviews Microbiology*, 15(6), 323–337. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.20>
- **Flannagan, R. S., Cosío, G., & Grinstein, S.** (2009). Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature Reviews Microbiology*, 7(5), 355–366. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2128>

- **Giannella, R. A., Broitman, S. A., & Zamcheck, N.** (1972). Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man: studies in vivo and in vitro. *Gut*, 13(4), 251–256. <https://doi.org/10.1136/gut.13.4.251>
- **Goulas, T., Cuppari, A., Garcia-Castellanos, R., Snipas, S., Glockshuber, R., Arolas, J. L., & Gomis-Rüth, F. X.** (2014). The pCri System: a vector collection for recombinant protein expression and purification. *PLoS ONE*, 9(11), e112643. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112643>
- **Guerrero, F., Ciragan, A., & Iwai, H.** (2015). Tandem SUMO fusion vectors for improving soluble protein expression and purification. *Protein Expression and Purification*, 116, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.08.019>
- **Hensel, M., Shea, J. E., Gleeson, C., Jones, M. D., Dalton, E., & Holden, D. W.** (1995). Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science*, 269(5222), 400–403. <https://doi.org/10.1126/science.7618105>
- **Hohmann E. L.** (2001). Nontyphoidal salmonellosis. *Clinical Infectious Diseases*, 32(2), 263–269. <https://doi.org/10.1086/318457>
- **Hume, P. J., Singh, V., Davidson, A. C., & Koronakis, V.** (2017). Swiss Army Pathogen: The *Salmonella* entry toolkit. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 348. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00348>
- **Jahn, M., Vorpahl, C., Hübschmann, T., Harms, H., & Müller, S.** (2016). Copy number variability of expression plasmids determined by cell sorting and Droplet Digital PCR. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 211. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0610-8>
- **Kessin RH.** (2001). *Dictyostelium* - evolution, cell biology, and the development of multicellularity. Cambridge UK: Cambridge Univ Press
- **Liss, V., Swart, A. L., Kehl, A., Hermanns, N., Zhang, Y., Chikkaballi, D., Böhles, N., Deiwick, J., & Hensel, M.** (2017). *Salmonella* enterica remodels the host cell endosomal system for efficient intravacuolar nutrition. *Cell Host and Microbe*, 21(3), 390–402. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.02.005>
- **Lou, L., Zhang, P., Piao, R., & Wang, Y.** (2019). *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and its complex regulatory network. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 270. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00270>
- **Martínez-García, E., Fraile, S., Algar, E., Aparicio, T., Velázquez, E., Calles, B., Tas, H., Blázquez, B., Martín, B., Prieto, C., Sánchez-Sampedro, L., Nørholm, M. H. H., Volke, D. C., Wirth, N. T., Dvořák, P., Alejandre, L., Grozinger, L.,**

- Crowther, M., Goñi-Moreno, A., Nickel, P. I., Nogales, J., de Lorenzo, V.** (2023). SEVA 4.0: an update of the Standard European Vector Architecture database for advanced analysis and programming of bacterial phenotypes. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D1558–D1567. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1059>
- **Oke, M. T., & D'Costa, V. M.** (2024). Functional divergence of the paralog *Salmonella* effector proteins SopD and SopD2 and their contributions to infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(8), 4191. <https://doi.org/10.3390/ijms25084191>
  - **Reeves, M. W., Evins, G. M., Heiba, A. A., Plikaytis, B. D., & Farmer, J. J., 3rd** (1989). Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other *Salmonellae* as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(2), 313–320. <https://doi.org/10.1128/jcm.27.2.313-320.1989>
  - **Riquelme, S., Varas, M., Valenzuela, C., Velozo, P., Chahin, N., Aguilera, P., Sabag, A., Labra, B., Álvarez, S. A., Chávez, F. P., & Santiviago, C. A.** (2016). Relevant genes linked to virulence are required for *Salmonella* Typhimurium to survive intracellularly in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1305. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01305>
  - **Savitskiy, S., & Itzen, A.** (2021). SopD from *Salmonella* specifically inactivates Rab8. *Biochimica et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics*, 1869(8), 140661. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2021.140661>
  - **Savitskiy, S., Wachtel, R., Pourjafar-Dehkordi, D., Kang, H. S., Trauschke, V., Lamb, D. C., Sattler, M., Zacharias, M., & Itzen, A.** (2020). Proteolysis of Rab32 by *Salmonella* GtgE induces an inactive GTPase conformation. *iScience*, 24(1), 101940. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101940>
  - **Solano-Collado, V., Rofe, A., & Spanò, S.** (2018). Rab32 restriction of intracellular bacterial pathogens. *Small GTPases*, 9(3), 216–223. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1219207>
  - **Spanò, S., & Galán, J. E.** (2012). A Rab32-dependent pathway contributes to *Salmonella* Typhi host restriction. *Science*, 338(6109), 960–963. <https://doi.org/10.1126/science.1229224>
  - **Spanò, S., Gao, X., Hannemann, S., Lara-Tejero, M., & Galán, J. E.** (2016). A bacterial pathogen targets a host Rab-family GTPase defense pathway with a GAP. *Cell Host and Microbe*, 19(2), 216–226. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.01.004>

- **Spanò, S., Liu, X., & Galán, J. E.** (2011). Proteolytic targeting of Rab29 by an effector protein distinguishes the intracellular compartments of human-adapted and broad-host *Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(45), 18418–18423. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111959108>
- **Srikanth, C. V., Mercado-Lubo, R., Hallstrom, K., & McCormick, B. A.** (2011). *Salmonella* effector proteins and host-cell responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(22), 3687–3697. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0841-0>
- **Steele-Mortimer O.** (2008). The *Salmonella*-containing vacuole: moving with the times. *Current Opinion in Microbiology*, 11(1), 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.01.002>.
- **Tamura, K., Ohbayashi, N., Maruta, Y., Kanno, E., Itoh, T., & Fukuda, M.** (2009). Varp is a novel Rab32/38-binding protein that regulates Tyrp1 trafficking in melanocytes. *Molecular Biology of the Cell*, 20(12), 2900–2908. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-12-1161>
- **Teklemariam, A. D., Al-Hindi, R. R., Albiheyri, R. S., Alharbi, M. G., Alghamdi, M. A., Filimban, A. A. R., Al Mutiri, A. S., Al-Alyani, A. M., Alseghayer, M. S., Almaneea, A. M., Albar, A. H., Khormi, M. A., & Bhunia, A. K.** (2023). Human salmonellosis: A continuous global threat in the farm-to-fork food safety continuum. *Foods*, 12(9), 1756. <https://doi.org/10.3390/foods12091756>
- **Wachtel, R., Bräuning, B., Mader, S. L., Ecker, F., Kaila, V. R. I., Groll, M., & Itzen, A.** (2018). The protease GtgE from *Salmonella* exclusively targets inactive Rab GTPases. *Nature Communications*, 9(1), 44. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02110-1>
- **Wiedemann, A., Virlogeux-Payant, I., Chaussé, A. M., Schikora, A., & Velge, P.** (2015). Interactions of *Salmonella* with animals and plants. *Frontiers in Microbiology*, 5, 791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00791>