

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS**



**“Identificación a escala genómica de genes involucrados
en la supervivencia intracelular de *Salmonella*
Typhimurium en el protozoo *Dictyostelium discoideum*”**

**Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Bioquímica
Área de Especialización: Bioquímica de Proteínas y Biotecnología**

Memoria para Optar al Título de Bioquímico

SEBASTIÁN ANDRÉS RIQUELME BARRIOS

Directores de Tesis

Dr. Carlos A. Santiviago

Dr. Francisco P. Chávez

SANTIAGO - CHILE

2016

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por el candidato:

SEBASTIÁN ANDRÉS RIQUELME BARRIOS

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, área de especialización en Bioquímica de Proteínas y Biotecnología y al título de Bioquímico, en el examen de defensa de Tesis rendido el día 28 de enero del 2016.

Directores de Tesis:

Dr. Carlos A. Santiviago Cid _____

Dr. Francisco Chávez Espinoza _____

Comisión Informante de Tesis:

Dra. Daniela Seelenfreund Hirsch _____

Dr. Christian A.M. Wilson Moya _____

Dr. Juan Carlos Salazar Garrido _____

AGRADECIMIENTOS

Al término de esta etapa, colmada de triunfos y alegrías quisiera agradecer a todos los que de una u otra manera han estado a mi lado.

Quisiera agradecer a mis padres, Yoli y Lucho, por criarme en libertad, la libertad para decidir, para elegir, para pensar y sentir. Quisiera agradecer a mi hermano Luis y mis hermanas María José y Paola, quienes me inspiran y alientan. A toda mi familia, por la alegría y el apoyo durante este tiempo.

En especial agradezco a mi compañera Eli por su cariño, paciencia, comprensión y compañía en las alegrías y fracasos durante estos últimos 7 años de mi vida, sin tí todo esto no sería posible.

Quisiera agradecer al Dr. Carlos Santiviago y el Dr. Francisco Chávez por su guía, ayuda y confianza en cada etapa de este proceso. Agradecer al Dr. Sergio Álvarez y la Dra Daniela Seelenfreund por su cercanía y eterno consejo. Agradecer al Dr Michael McClelland por su ayuda y hospitalidad durante mi estadía en USA.

Agradezco también a cada uno de los miembros del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile por su buena onda, compromiso y compañerismo. En especial a Maca, Paula, Andrea y Camila quienes han ayudado en cada objetivo de este trabajo.

Agradezco a los románticos estudiantes de bioquímica, mis compañeros y amigos por tantos momentos de diversión, conversaciones y alegrías.

Dedico esta tesis a todos los que desafían lo establecido, que no se conforman, no claudican y que a través de su lucha han devuelto la dignidad a Chile. Dedico mi tesis a mi "U"... te he conocido publica... y hoy te dejo, un poco más libre, un poco más gratis...

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, bajo la dirección de los profesores Dres. Carlos A. Santiviago y Francisco P. Chávez.

La tesis contó con financiamiento de los proyectos FONDECYT 1140754 y 1120209 y la Beca CONICYT para Estudios de Magíster Nacional, folio 221320275. La pasantía realizada en el laboratorio del Dr. Michael McClelland (University of California, Irvine, CA, E.E.U.U) fue financiada por una Beca de Estadías Cortas de Investigación del Departamento de Posgrado y Postítulo de la Universidad de Chile, convocatoria 2014-2015.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS INTERNACIONALES

Sebastián Riquelme, Macarena Varas, Camila Valenzuela, Paula Velozo, Nicolás Chahin, Sergio A. Álvarez, Francisco Chávez, Carlos A. Santiviago. “*Salmonella* Typhimurium requires SPI-1, SPI-2 and PhoP/Q to survive intracellularly in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*”. 115th General Meeting of the American Society for Microbiology, 30 de Mayo al 2 de Junio de 2015, New Orleans, Louisiana, USA (presentación en panel).

Sebastián Riquelme, Macarena Varas, Catalina Bravo-Toncio, Francisco Chávez, Carlos A. Santiviago. “*Salmonella* Typhimurium is able to survive intracellularly in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*”. XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología, 5 al 8 de Noviembre de 2014, Cartagena de Indias, Colombia (presentación en panel).

Macarena Varas, **Sebastián Riquelme**, Catalina Bravo-Toncio, Camila Valenzuela, Carlos A. Santiviago, Francisco Chávez. “Attenuated virulence of a polyphosphate kinase 1 null mutant of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium in *Dictyostelium discoideum* and *Danio rerio*”. XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología, 5 al 8 de Noviembre de 2014, Cartagena de Indias, Colombia (presentación en panel).

PRESENTACIONES EN CONGRESOS NACIONALES

Sebastián Riquelme, Macarena Varas, Nicolás Chahin, Paula Velozo, Camila Valenzuela, Cristian Bravo, Verónica Barra, Víctor Martínez, Juan Ugalde, Sergio A. Álvarez, Michael McClelland, Francisco Chávez, Carlos A. Santiviago. “Identificación de genes involucrados en la supervivencia intracelular de *Salmonella* Typhimurium en *Dictyostelium discoideum*”. XXXVII Congreso Chileno de Microbiología, 1 al 4 de diciembre de 2015, La Serena, Chile (presentación oral).

Sebastián Riquelme, Macarena Varas, Catalina Bravo-Toncio, Francisco Chávez, Carlos A. Santiviago. “*Salmonella* enterica serovar Typhimurium es capaz de sobrevivir en la ameba *Dictyostelium discoideum*”. XXXVI Congreso Chileno de Microbiología, 2 al 5 de diciembre de 2014, La Serena, Chile (presentación en panel).

Nicolás Chahin, **Sebastián Riquelme**, Paula Velozo, Francisco Chávez, Sergio A. Álvarez, Carlos A. Santiviago. “Los sistemas de secreción T3SS-1 y T3SS-2 de *Salmonella* enterica serovar Typhimurium son necesarios para la supervivencia intracelular en la ameba *Dictyostelium discoideum*”. XXXVI Congreso Chileno de Microbiología, 2 al 5 de diciembre de 2014, La Serena, Chile (presentación en panel).

Macarena Varas, **Sebastián Riquelme**, Catalina Bravo-Toncio, Camila Valenzuela, Miguel Allende, Carlos A. Santiviago, Francisco Chávez. “La deficiencia en la síntesis de los polifosfatos inorgánicos disminuye la virulencia de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en *Dictyostelium discoideum* y *Danio rerio*”. XXXVI Congreso Chileno de Microbiología, 2 al 5 de diciembre de 2014, La Serena, Chile (presentación en panel).

Camila Valenzuela, **Sebastián Riquelme**, Macarena Varas, Sergio A. Álvarez, Francisco Chávez, Carlos A. Santiviago. “El sistema de dos componentes PhoP/PhoQ es requerido para la supervivencia de *Salmonella* Typhimurium al interior del protozoo *Dictyostelium discoideum*”. XXXVI Congreso Chileno de Microbiología, 2 al 5 de diciembre de 2014, La Serena, Chile (presentación en panel).

ÍNDICE

ÍNDICE	vii
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xiii
SUMMARY	xv
1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades de <i>Salmonella</i>	1
1.2 <i>Dictyostelium discoideum</i>	3
1.3 <i>Salmonella</i> y protozoos.....	5
1.4 Estudios genéticos en <i>Salmonella</i>	7
1.5 Hipótesis	10
1.6 Objetivo general.....	10
1.7 Objetivo específicos.....	10
2.- MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.1 Reactivos	11
2.2 Cepas bacterianas	12
2.3 Líneas celulares.....	13
2.4 Medios y condiciones de cultivo bacteriano	13
2.5 Medios y condiciones de cultivo celular	13
2.6 Partidores	14
2.7 Ensayos de fagocitosis	15
2.7.1 Condiciones generales	15
2.7.2 Ensayos de coincubación	15
2.7.3 Ensayos de preincubación.....	15
2.7.4 Expresión de los resultados.....	16
2.8 Ensayos de competencia.....	18

2.8.1	Expresión de los resultados.....	18
2.9	Análisis estadísticos de los datos de distintos ensayos de infección.....	19
2.10	Infección usando la genoteca de mutantes SGD-K de <i>S. Typhimurium</i> 14028s	19
2.11	Generación de una genoteca para secuenciación masiva de DNA mediante el sistema <i>MiSeq</i> de Illumina	20
2.11.1	Extracción de DNA genómico.....	20
2.11.2	Digestión enzimática.....	22
2.11.3	Ligación	22
2.11.4	Amplificación de fragmentos mediante PCR	23
2.11.5	Purificación desde gel de agarosa.....	25
2.12	Secuenciación masiva de DNA.....	25
2.12.1	Análisis de los datos de secuenciación	26
3.-	RESULTADOS.....	27
3.1	Evaluación de la capacidad infectiva de <i>Salmonella</i> Typhimurium en <i>Dictyostelium discoideum</i> bajo distintas condiciones experimentales....	27
3.2	Estandarización del ensayo de fagocitosis	31
3.3	Evaluación de la participación de algunos genes asociados con patogenicidad en otros modelos de infección en la supervivencia de <i>Salmonella</i> Typhimurium en <i>Dictyostelium discoideum</i>	33
3.4	Ensayos de competencia.....	35
3.5	Identificación a escala genómica de los genes de <i>Salmonella</i> Typhimurium involucrados en la supervivencia intracelular en <i>Dictyostelium discoideum</i>	37
3.6	Generación de las genotecas para secuenciación de DNA mediante el sistema <i>MiSeq</i> de Illumina.....	38
3.7	Secuenciación de las genotecas y análisis de los datos obtenidos	41
4.-	DISCUSIÓN	46
4.1	<i>S. Typhimurium</i> es capaz de sobrevivir intracelularmente en <i>D. discoideum</i>	46

4.2 Validación de nuestros ensayos de infección de <i>D. discoideum</i> usando mutantes de <i>S. Typhimurium</i> en genes asociados a patogenicidad en otros modelos.....	47
4.3 Identificación a escala genómica de genes involucrados en la supervivencia intracelular de <i>S. Typhimurium</i> en <i>D. discoideum</i>	48
5.- CONCLUSIONES	52
6.- BIBLIOGRAFIA.....	53
7.- ANEXO	58
7.1 Mutantes de <i>Salmonella Typhimurium</i> bajo selección negativa en <i>Dictyostelium discoideum</i>	58

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

Tabla 1.	Cepas bacterianas utilizadas en esta tesis	12
Tabla 2.	Líneas celulares utilizadas en esta tesis	13
Tabla 3.	Partidores utilizados en esta tesis	14
Tabla 4.	Protocolo de digestión enzimática.....	22
Tabla 5.	Protocolo de ligación	22
Tabla 6.	Temperaturas de ligación.....	23
Tabla 7.	Protocolo de amplificación para la primera PCR.....	23
Tabla 8.	Temperaturas de amplificación para la primera PCR.....	24
Tabla 9.	Protocolo de amplificación para la segunda PCR	24
Tabla 10	Temperaturas de amplificación para la segunda PCR	25
Tabla 11.	Datos de infección de <i>D. discoideum</i> usando la SGD-K	37

Figuras

Figura 1.	Ciclo infectivo de <i>Salmonella</i>	3
Figura 2.	Ciclo de vida de <i>D. discoideum</i>	4
Figura 3.	Esquema del ensayo de preincubación.....	17
Figura 4.	Esquema de la generación de una genoteca para secuenciación de DNA mediante el sistema <i>MiSeq</i> de Illumina	21
Figura 5.	Ensayo de coincubación usando una MOI de 100 bacterias/célula	28
Figura 6.	Ensayo de coincubación usando una MOI de 1000 bacterias/célula ...	28
Figura 7.	Ensayo de preincubación usando MOIs de 100 y	30
Figura 8.	Comparación de distintos protocolos para evaluar la supervivencia intracelular de <i>S. Typhimurium</i> en <i>D. discoideum</i>	32
Figura 9.	Ensayos de infección simple	34
Figura 10.	Ensayos de competencia	36
Figura 11.	Geles representativos de las distintas etapas del protocolo de generación de genotecas de secuenciación	40
Figura 12.	Gráficos de correlación entre replicas biológicas	43
Figura 13.	Análisis de los datos de secuenciación	44
Figura 14.	Análisis de categorías funcionales de grupos ortólogos (COGs)	45

ABREVIATURAS

Amp	:	Ampicilina
°C	:	Grados Celsius
Cam	:	Cloranfenicol
COGs	:	<i>Clusters of ortologous groups</i>
DNA	:	Ácido desoxirribonucleico
DO	:	Densidad óptica
EDTA	:	Ácido etilendiamonotetraacético
g	:	Gramos
gDNA	:	DNA genómico
Gen	:	Gentamicina
g/L	:	Gramos por litro
IC	:	Índice de competencia
Kan	:	Kanamicina
kb	:	Kilobases
kDa	:	Kilodalton
L	:	Litros
LB	:	Caldo Luria-Bertani
mg	:	Miligramos
min	:	Minutos
mL	:	Mililitros
MOI	:	Multiplicidad de infección
ng	:	Nanogramos
p/v	:	Peso/volumen
PCR	:	Reacción en cadena de la polimerasa
pb	:	Pares de bases
rpm	:	Revoluciones por minuto
seg	:	Segundos
SGD-K	:	<i>Single-gene deletion Kan^R</i>
STM	:	<i>Signature-tagged mutagenesis</i>

Str	:	Estreptomicina
TAE	:	Solución amortiguadora Tris-acetato-EDTA
Tmp	:	Trimetoprim
UFC	:	Unidades formadoras de colonias
UV	:	Ultra violeta
v/v	:	Volumen/volumen
µg	:	Microgramos
µL	:	Microlitros

RESUMEN

Los mecanismos moleculares que permiten a *Salmonella* Typhimurium causar enfermedades en mamíferos son numerosos y generan manifestaciones clínicas que abarcan desde una colitis hasta septicemia y la posterior muerte del hospedero. Estos mecanismos se relacionan con su capacidad de infectar en primera instancia células epiteliales del tracto digestivo y su posterior supervivencia y replicación en células fagocíticas. Esto es posible gracias a la existencia de factores de virulencia que se encuentran codificados en genes localizados mayoritariamente en islas de patogenicidad o en el plasmidio de virulencia de *Salmonella*. La gran mayoría de estos mecanismos han sido caracterizados en la infección del modelo murino o aviar. En este trabajo buscamos identificar los genes de *S. Typhimurium* que están implicados en la supervivencia de esta bacteria dentro de organismos eucariontes simples tales como amebas. Considerando que *Salmonella* podría interactuar con estos organismos en el medio ambiente, en este trabajo se usó como modelo de estudio la ameba social *Dictyostelium discoideum*, que de acuerdo a nuestras observaciones sería incapaz de degradar a *Salmonella*. Esto es interesante si se toma en cuenta que las amebas presentan una estrecha relación con los macrófagos, ya que ambas son células eucariontes que comparten muchos de los mecanismos implicados en el proceso de fagocitosis.

Para estudiar la supervivencia de *Salmonella* al interior de *D. discoideum* implementamos un ensayo de competencia infectando esta ameba con *S. Typhimurium* 14028s y mutantes definidas. Nuestros resultados indican que las mutantes $\Delta invA$ y $\Delta ssaD$ (relacionadas directamente con la patogenicidad de *Salmonella* en otros modelos de infección) y $\Delta aroA$ (mutante metabólica), presentan problemas de supervivencia en *D. discoideum* en comparación con la cepa silvestre parental. Posteriormente, para identificar el conjunto de genes involucrados en la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en este organismo modelo realizamos infecciones de *D. discoideum* utilizando una genoteca de ~3690 mutantes de *S. Typhimurium* 14028s por delección de genes individuales,

que contienen un *cassette* de resistencia a kanamicina. Desarrollamos un protocolo que permite amplificar y secuenciar las regiones adyacentes a la inserción de este *cassette* e identificar a nivel genómico cada una de las mutantes presentes en la población recuperada desde *D. discoideum*. Mediante este análisis a gran escala fue posible identificar un total de 81 mutantes bajo selección negativa. Entre las mutantes identificadas podemos mencionar a $\Delta orgB$, gen que codifica un componente esencial para el funcionamiento del sistema de secreción tipo III (T3SS) codificado en la isla de patogenicidad SPI-1 y 3 mutantes ($\Delta ssrA$, $\Delta ssaR$ y $\Delta pipB2$) cuya función se asocia al T3SS codificado en la isla de patogenicidad SPI-2. El análisis a escala genómica también nos permitió tener una idea general del ambiente en el que se encuentra *S. Typhimurium* al interior de *D. discoideum*. Esta idea surge de la selección negativa que presentan mutantes en genes como *rpoE* y *creB*, que codifican proteínas que participan de la regulación transcripcional de genes asociados con la respuesta al estrés extracitoplasmático y al crecimiento en medio mínimo, respectivamente. En conjunto, los resultados de esta tesis constituyen un primer paso para comprender la interacción entre *Salmonella* y la ameba *D. discoideum* a nivel molecular.

SUMMARY

Genome-wide identification of genes involved in the intracellular survival of *Salmonella* Typhimurium in *Dictyostelium discoideum*

The molecular mechanisms that allow *Salmonella* Typhimurium to cause disease in mammals are numerous, and are responsible for clinical traits ranging from a self-limited colitis to septicemia and eventually the death of the host. These mechanisms are related to the ability of the pathogen to infect epithelial cells in the small intestine and its intracellular survival and growth in phagocytic cells of the host. This ability is the result of genes coding for virulence factors generally located in pathogenicity islands or in the *Salmonella* virulence plasmid. The vast majority of these mechanisms have been characterized using murine and avian infection models. In this work, we aimed to identify *S. Typhimurium* genes involved in the survival of this pathogen in simple eukaryotic organisms like amoebas. Considering that *Salmonella* can interact with these organisms in the environment, in this work we used the social amoeba *Dictyostelium discoideum* as a model. According to our data, this organism is unable to degrade *Salmonella* after phagocytosis. This is remarkable considering that amoebas show a close relationship with macrophages, both being eukaryotic cells that share many phagocytosis mechanisms.

To study the intracellular survival of *Salmonella* in *D. discoideum* we developed a competition assay where the amoeba was infected with *S. Typhimurium* 14028s and selected derivative mutants. Our data show that mutants $\Delta invA$ and $\Delta ssaD$ (directly related to pathogenicity in other infection models) and $\Delta aroA$ (metabolic mutant) have an impaired intracellular survival in *D. discoideum* as compared to the wild-type strain. Later, in order to identify the complement of genes involved in the intracellular survival of *S. Typhimurium* in this organism, we infected *D. discoideum* using a single-gene deletion mutant library of *S. Typhimurium* 14028s (~3690 mutants), containing a kanamycin resistance cassette. We developed a protocol to amplify and sequence the genomic region adjacent to the resistance cassette. This protocol allowed us to identify at the genomic level the

mutants present in the population of bacteria recovered from *D. discoideum*. Using this genomic analysis, we identified 81 mutants under negative selection. Relevant mutants in this group include $\Delta orgB$, a gene that encodes an essential component required for the function of the T3SS encoded in SPI-1, and 3 mutants ($\Delta ssrA$, $\Delta ssaR$ and $\Delta pipB2$) in genes associated to the T3SS encoded in SPI-2. Furthermore, our genomic analysis allowed us to have a general idea of the environment faced by *Salmonella* within *D. discoideum*. This notion comes from the negative selection observed for mutants in genes such as *rpoE* and *creB*, coding proteins involved in the transcriptional regulation of genes associated to extracytoplasmatic stress and growth in minimal media, respectively. Taken together, the results in this work are the first step in the understanding of the molecular mechanisms involved in the interaction between *Salmonella* and *D. discoideum*.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de *Salmonella*

El género *Salmonella* comprende dos especies, *S. bongori* y *S. enterica*, las cuales reúnen a más de 2500 serovares (Brenner *et al.*, 2000). La especie *S. enterica* se divide a su vez en 6 subespecies y la mayoría de los serovares pertenecientes a la subespecie *enterica* son responsables del 99% de los casos de salmonelosis en animales de sangre caliente. Representantes de las demás subespecies de *S. enterica*, así como de *S. bongori*, han sido aisladas de animales de sangre fría o del medio ambiente (Grimont y Weill, 2008).

Los serovares de *S. enterica* causan una gran variedad de enfermedades que abarcan desde una diarrea leve hasta una enfermedad sistémica severa que puede resultar en la muerte del hospedero. Además, los serovares de *S. enterica* presentan notables diferencias en el rango de hospederos que infectan. Existen serovares que causan enfermedad en una amplia gama de hospederos animales incluyendo los humanos, por lo que se les denomina “generalistas”. Los principales ejemplos de serovares generalistas corresponden a *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*. En cambio, otros serovares infectan un rango limitado de hospederos o un hospedero único y se denominan “especialistas”. Los principales ejemplos de serovares especialistas son *S. Typhi* y *S. Gallinarum*, que causan enfermedad sólo en humanos y aves, respectivamente (Canals *et al.*, 2011). Cepas de *Salmonella* no tifoideas (NTS) son responsables de ocasionar infección bacteriana en el torrente sanguíneo, principalmente en niños y adultos en sectores de África subsahariana, en particular en grupos de adultos infectados con VIH y niños menores de 3 años, donde la mortalidad es más alta. Distinto es lo que sucede en el mundo desarrollado, donde las enfermedades ocasionadas por NTS son usualmente una colitis auto limitada con una baja mortalidad (Morpeth *et al.*, 2009; MacLennan *et al.*, 2008).

Salmonella ingresa al organismo por vía oral mediante el consumo de agua o alimentos contaminados. La bacteria es capaz de sobrevivir al pH ácido del

estómago y logra llegar al intestino delgado donde atraviesa el epitelio preferentemente a través de las células M. Una vez que *Salmonella* atraviesa el epitelio entra en contacto con células fagocíticas del hospedero (**Figura 1**). Los serotipos de *Salmonella* asociados con enfermedades sistémicas ingresan a los macrófagos intestinales y se diseminan a través del sistema retículo endotelial. Por otra parte las cepas no tifoideas inducen una respuesta inflamatoria local que resulta en la infiltración de polimorfonucleares (PMNs) en el lumen intestinal y provoca diarrea (Haraga *et al.*, 2008).

Como se mencionó, *Salmonella* es capaz de colonizar las células epiteliales del tracto digestivo y los macrófagos de sus hospederos mamíferos (Salcedo *et al.*, 2001). Este proceso es mediado por un sistema de secreción de proteínas de tipo III (T3SS) que se encuentra codificado en la Isla de Patogenicidad 1 de *Salmonella* (SPI-1). Una vez dentro de las células eucariontes, la bacteria es capaz de sobrevivir y replicarse en el interior de un fagosoma modificado, conocido como “vacuola que contiene *Salmonella*” (SCV). Para esto, es necesario un segundo T3SS que se encuentra codificado en la isla SPI-2 que permite establecer un nicho replicativo dentro de la célula eucarionte mediante la secreción de varias proteínas efectoras (Ibarra y Steele-Mortimer, 2009). *Salmonella* también posee la isla SPI-3, que está involucrada en el crecimiento dentro del macrófago y la supervivencia en condiciones limitantes de Mg^{+2} (Blanc-Potard *et al.*, 1999). También se ha descrito la isla SPI-4, que codifica un sistema de secreción de proteínas del tipo I y una adhesina no fimbrial secretada por este sistema y que está involucrada en la adherencia de *Salmonella* a células epiteliales polarizadas (Wong *et al.*, 1998; Gerlach *et al.*, 2007). Finalmente, la isla SPI-5 codifica proteínas efectoras secretadas por los T3SS que se encuentran codificados en SPI-1 y SPI-2. Estas proteínas efectoras promueven la secreción de fluidos y la respuesta inflamatoria, siendo importantes para la colonización entérica pero no para la infección sistémica del hospedero (Wood *et al.*, 1998). Además, algunos serotipos de *Salmonella* poseen un plasmidio de virulencia de 90 kb que presenta 5 genes que participan en el crecimiento dentro de células hospederas y en la interacción de la bacteria con el sistema inmune del hospedero. Estos 5 genes son

suficientes para restaurar la virulencia de *Salmonella* cuando se infectan ratones con cepas que no poseen plasmidio de virulencia (Gulig *et al.*, 1993).

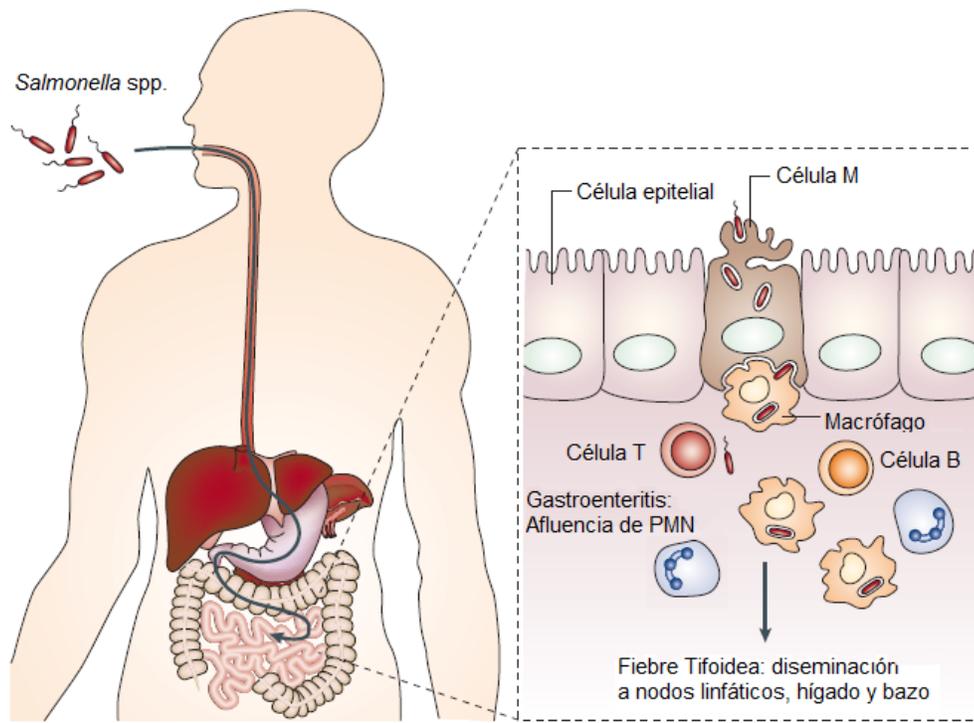


Figura 1.- Ciclo infeccioso de *Salmonella*. Luego de ser ingerida, *Salmonella* es capaz de sobrevivir al pH ácido del estómago, alcanzando el intestino delgado. En el íleon atraviesa la barrera intestinal preferentemente a través de las células M. Luego, la bacteria es transportada hacia las placas de Peyer subyacentes, donde se encuentra con células de sistema inmune, como macrófagos y linfocitos B y T. Los serovares capaces de generar infección sistémica son fagocitados por macrófagos y se diseminan hacia los nódulos linfáticos y posteriormente a otros órganos, como el hígado y el bazo. Los serovares que causan gastroenteritis generan una respuesta inflamatoria local que culmina con la eliminación de la bacteria. Esquema modificado de Haraga *et al.*, 2008.

1.2 *Dictyostelium discoideum*

Dictyostelium discoideum es una ameba, organismo eucarionte unicelular cuyo hábitat principal corresponde al suelo de los bosques. Esta ameba se alimenta de bacterias mediante fagocitosis y prolifera por fisión binaria (**Figura 2**). En condiciones de carencia de alimentos, las células de *D. discoideum* se agregan y sufren un proceso de diferenciación que da origen a un organismo multicelular

(Figura 2), por lo cual se le conoce como ameba social (Kessin, 2001). Esta ameba ha sido utilizada durante los últimos años como un hospedero alternativo para estudiar la patogénesis de diversas bacterias y hongos que causan daño al ser humano. Esto se debe a que muchos de los mecanismos moleculares implicados en la fagocitosis protista son conservados en las células fagocíticas de los mamíferos (Escoll *et al.*, 2013). Sumado a esto, se cree que los eucariontes unicelulares constituyen un reservorio en que diferentes bacterias patógenas pueden desarrollar y seleccionar factores de virulencia que luego podrían ser usados durante la infección de hospederos animales, incluyendo a los seres humanos (Cosson y Soldati, 2008).

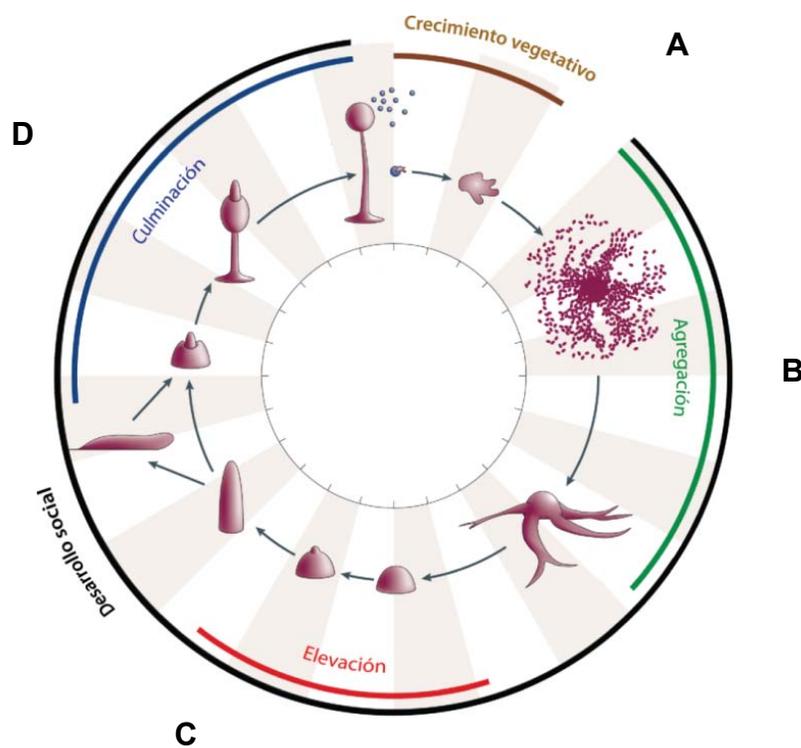


Figura 2.- Ciclo de vida de *D. discoideum*. La ameba en estado vegetativo se alimenta de bacterias mediante fagocitosis (A). En condiciones de carencia de nutrientes, ésta comienza un proceso de agregación celular (B) que resulta en el desarrollo de un organismo multicelular que responde a estímulos quimiotácticos en busca de alimento (C). Al finalizar este proceso se genera una estructura denominada cuerpo fructífero que presenta diferenciación de tejidos. La parte superior de esta estructura se denomina soro y contiene esporas que generan la forma unicelular en condiciones propicias (D). Esquema modificado de Gaudet *et al.*, 2008.

El cultivo y manejo de *D. discoideum* es relativamente sencillo ya que crece a temperatura ambiente y en medios microbiológicos simples y de bajo costo. Además, el genoma de esta ameba se encuentra totalmente secuenciado (Eichinger *et al.*, 2005), lo que sumado a su plasticidad génica ha facilitado la generación de mutantes cuyo análisis ha permitido determinar gran cantidad de factores genéticos del hospedero que afectan el proceso de infección.

1.3 *Salmonella* y protozoos

En la literatura se ha reportado que distintas bacterias patógenas para los humanos (como *Legionella*, *Pseudomonas* y *Mycobacterium*) también lo son para *D. discoideum*. Sin embargo, los antecedentes respecto a *S. Typhimurium* en su mayoría plantean que esta bacteria es degradada rápidamente cuando es fagocitada por la ameba. Así, se ha reportado que *S. Typhimurium* es captada de manera eficiente por *D. discoideum*, luego de lo cual la bacteria es incapaz de replicarse en el ambiente intracelular (Bozzaro y Eichinger, 2011). No obstante, al usar mutantes nulas de *D. discoideum* en los genes *atg1*, *atg6* y *atg7* se observa una inactivación de la vía de degradación lisosomal de la ameba, aumentando con ello la replicación intracelular de la bacteria (Jia *et al.*, 2009). Además, se ha reportado que *S. Typhimurium* sobrevive de manera transitoria dentro de una cepa mutante de *D. discoideum* que no expresa la proteína “comitina” (proteína presente en el aparato de Golgi que une F-actina), pero es incapaz de sobrevivir dentro de la cepa silvestre de *D. discoideum* (Skriwan *et al.*, 2002).

Usando otras amebas como modelo ha sido posible observar que el fenómeno de infección por *Salmonella* es complejo y depende de múltiples factores. Por ejemplo, se ha descrito que *Acanthamoeba rhyssodes* presenta una preferencia en la captación de *S. Dublin* por sobre *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*. Esto se puede explicar por diferencias en la composición del antígeno-O de cada serovar, que es reconocido mediante un receptor tipo lectina de la ameba (Tezcan-Merdol *et al.*, 2004). También existen diferencias en la captación de *S. Dublin* y *S. Typhimurium* dependiendo de las condiciones de crecimiento empleadas para estas bacterias, puesto que ciertos factores de virulencia codificados en la SPI-1 se expresan en

medio LB y no en otros. Sin embargo, al usar mutantes de *S. Dublin* en el gen que codifica la proteína HilA (activador transcripcional de los genes de SPI-1) éstas no disminuyeron su capacidad de ingresar en *A. rhysodes*, lo que indica que SPI-1 no está implicada en este proceso (Tezcan-Merdol *et al.*, 2004).

En la literatura, la aproximación experimental más común para analizar las bacterias viables luego de ser fagocitadas por células eucariontes (como macrófagos y amebas) recurre al uso de antibióticos a fin de eliminar o impedir el crecimiento de las bacterias que se encuentran en el medio de cultivo y que no han sido fagocitadas. Es aquí donde surge una controversia, puesto que algunos autores señalan que la gentamicina (Gen), el antibiótico más usado en este tipo de ensayos, sería capaz de ingresar al citoplasma de la ameba y actuar sobre las bacterias intracelulares. Notablemente, al realizar ensayos de fagocitosis sin el uso de Gen u otros antibióticos y variando las condiciones de cultivo bacteriano, fue posible observar que *S. Typhimurium* es patógeno para *Dictyostelium*, causando una disminución o detención del crecimiento de la ameba e incluso la muerte en determinadas condiciones (Sillo *et al.*, 2011). Además, se observó que mutantes *ssaV* y *sseD* de *S. Typhimurium* que presentan un defecto en el T3SS codificado en SPI-2 son incapaces de inhibir el crecimiento y el desarrollo de *Dictyostelium* (Sillo *et al.*, 2011). Estos resultados sugieren que la isla SPI-2 está implicada en la patogenicidad de *S. Typhimurium* sobre *Dictyostelium*.

Cabe mencionar que la gran mayoría de los trabajos publicados en los que se utiliza a *D. discoideum* se enfocan principalmente en el estudio de factores del hospedero implicados en la fagocitosis, encontrándose en menor medida trabajos donde se analiza la existencia de genes del patógeno implicados en la infección y posterior replicación intracelular. Incluso, a la fecha son escasos los trabajos en que se ha intentado una identificación a escala genómica de genes implicados en la supervivencia o replicación de alguna bacteria al interior de amebas. Sin embargo, mediante hibridaciones de mRNA en microarreglos genómicos se ha comparado la expresión global de genes de las bacterias extracelulares e intracelulares luego de infectar *A. rhysodes* con *Salmonella*. En otro de estos

estudios, se determinó que genes de *S. Choleraesuis* codificados en SPI-2, SPI-3, SPI-9 y SPI-11 aumentaron su expresión en las bacterias intracelulares en comparación con las que crecen en el medio a las 2 horas post infección, pero luego esta expresión disminuyó a las 8 y 12 horas post infección (Feng *et al.*, 2009). Los autores relacionan este comportamiento con la aparición de la SCV, que ocurre a partir de las 4 horas de infección. Por otra parte, los genes codificados en SPI-1, SPI-4 y SPI-5 aumentaron sus niveles de expresión a las 12 horas post infección, fenómeno relacionado con la muerte de la ameba (Feng *et al.*, 2009). Un análisis más reciente de los patrones de expresión global de genes de *S. Typhimurium* al infectar *Tetrahymena* permitió observar un aumento en la expresión de genes pertenecientes al regulón PhoP/PhoQ (*envE*, *virK*, *mig-14* y *mgtBC*), genes asociados a la función de los T3SS codificados en SPI-1 (*sopB*) y SPI-2 (*ssaV* y *sifB*), así como otros genes implicados en la resistencia a condiciones de estrés ácido (*adiAY*) y resistencia a antibióticos (*marRAB*, *emrA* e *yddG*) (Rehfuss *et al.*, 2011).

A pesar de los estudios presentes en la literatura, todavía se conoce muy poco sobre los mecanismos moleculares implicados en la interacción de *Salmonella* con las amebas y otros protozoos.

1.4 Estudios genéticos en *Salmonella*

Los estudios genéticos que permitieron identificar importantes factores de virulencia de *Salmonella*, entre ellos los codificados en las islas SPI-1 y SPI-2, se realizaron mediante el análisis de genotecas de mutantes por inserción al azar de transposones (Galán y Curtiss, 1989; Hensel *et al.*, 1995). El posterior uso de una metodología denominada “*Signature-Tagged Mutagenesis*” (STM), que combina la mutagénesis por inserción de un transposón junto a un proceso de selección negativa, ha permitido analizar un conjunto de mutantes no esenciales de manera simultánea. La STM ha sido utilizada durante la infección de hospederos animales y consiste en introducir secuencias únicas contenidas en un transposón que permiten identificar mutantes individuales durante la infección (Hensel *et al.*, 1995). Sin embargo, y a pesar de ser una técnica bastante utilizada, la STM sólo

permite analizar una pequeña porción del genoma. Para resolver esto, se han generado nuevas estrategias experimentales que buscan aumentar el rendimiento de la STM mediante el uso de transposones que contiene promotores T7 o SP6 orientados hacia uno de los extremos del elemento mutagénico. Esto permite generar transcritos únicos para cada mutante, los que son posteriormente evaluados mediante hibridaciones comparativas utilizando microarreglos genómicos (Lawley *et al.*, 2006).

Cabe destacar que el uso de genotecas de transposones está asociado a importantes limitaciones técnicas, como la gran cantidad de mutantes que es necesario analizar para cubrir la totalidad del genoma o la pérdida aleatoria de mutantes que ocurre por las condiciones experimentales a la que son expuestas y que no responden a eventos de selección negativa. Además, la mutagénesis por inserción al azar de un transposón suele ocasionar efectos polares, alterando la expresión de genes río arriba o río abajo del elemento mutagénico.

Para evitar las limitaciones asociadas al uso de genotecas de transposones, han surgido nuevas técnicas en las que se usan genotecas que incluyen miles de mutantes por delección de genes únicos en las que se minimizan los efectos polares en genes río arriba o río abajo. Estas mutantes son generadas mediante una modificación del método de reemplazo alélico descrito por Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner, 2000; Santiviago *et al.*, 2009). Este desarrollo experimental combina el uso de una genoteca de mutantes específicas con el uso de un método de selección negativa similar al de STM (Santiviago *et al.*, 2009). Así, se comparan todas las mutantes que son usadas en el ensayo (muestras *input*) con aquellas que sobreviven al evento de selección negativa de interés (muestras *output*) son comparadas mediante hibridaciones competitivas en un microarreglo genómico. De esta forma, se reduce el número de mutantes necesarias para lograr la cobertura total del genoma y se minimizan los posibles efectos polares ocurridos en la mutagénesis generada por transposones. Esto permite aumentar la eficiencia y exactitud para detectar los genes de *Salmonella* que son responsables de un determinado fenotipo. Los datos permiten mapear las inserciones presentes en la

genoteca y comparar las poblaciones en distintas situaciones, como ocurriría en un proceso de selección negativa.

En esta tesis se propone identificar los genes de *S. Typhimurium* que están implicados en la supervivencia intracelular en *D. discoideum*. Para esto, se realizará un ensayo de fagocitosis que consiste en coincubar *D. discoideum* AX4 con bacterias de una genoteca de mutantes obtenidas mediante mutagénesis por reemplazo alélico de genes individuales de *S. Typhimurium* 14028s. La población de mutantes usada al comienzo del ensayo será comparada con la población de mutantes capaces de sobrevivir dentro del protozoo al cabo de un tiempo definido. Las mutantes en aquellos genes necesarios para sobrevivir dentro de *D. discoideum* serán incapaces de permanecer en el interior del protozoo y por lo tanto serán eliminadas de la población. Finalmente, es posible detectar las diferencias en las cantidades relativas de cada mutante en las muestras obtenidas durante el ensayo mediante secuenciación masiva de DNA.

1.5 Hipótesis

“*Salmonella* Typhimurium es capaz de sobrevivir en *Dictyostelium discoideum*. Los genes requeridos para este proceso pueden ser identificados a escala genómica mediante un análisis de mutantes bajo selección negativa”

1.6 Objetivo general

Determinar si *Salmonella* Typhimurium es capaz de sobrevivir en *Dictyostelium discoideum* e identificar a escala genómica los genes involucrados en este proceso mediante un análisis de mutantes bajo selección negativa.

1.7 Objetivo específicos

- 1.- Determinar si *Salmonella* Typhimurium es capaz de sobrevivir en *Dictyostelium discoideum*.
- 2.- Evaluar el modelo de selección negativa mediante la infección de *Dictyostelium discoideum* con mutantes de *Salmonella* Typhimurium que poseen un fenotipo conocido en otros modelos.
- 3.- Identificar a escala genómica los genes de *Salmonella* Typhimurium involucrados en la supervivencia intracelular en *Dictyostelium discoideum* mediante un análisis de mutantes bajo selección negativa.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos

A continuación se indican proveedores y los productos que de ellos se obtuvieron:

Advanced Analytical (IA, EEUU): Fragment Analyzer.

BIOTIUM (CA, EEUU): GelRed.

Becton, Dickinson and Company (MD, EEUU): Bacto agar.

Difco Laboratories (MI, EEUU): Triptona, extracto de levadura.

IDT (IO, EEUU): Todos los oligonucleótidos y partidores utilizados en esta tesis.

Gibco (NY, EEUU): Azul de tripán.

Invitrogen Life Technologies (CA, EEUU): DNA polimerasa *Taq*, proteinasa K.

Illumina (CA, EEUU): “*MiSeq Reagent Kit v3 (150-cycles)*”.

Merck Química Chilena Sociedad Ltda (Santiago, CHILE): Cloruro de sodio, fosfato dibásico de potasio, fosfato monobásico de potasio, fosfato dibásico de sodio, glucosa, etanol absoluto, sulfato de magnesio heptahidratado, solución amortiguadora TAE 50x, Tritón X-100, Tris-base.

New England Biolabs (MA, EEUU): 1 kb DNA ladder, 100pb DNA ladder, T4 DNA ligasa, endonucleasa *Acl*.

Qiagen (CA, EEUU): “*QIAquick PCR purification Kit*”, “*QIAquick Gel Extraction Kit*”.

Sigma Chemical Co (MO, EEUU): Azida de sodio, ampicilina, cloranfenico, gentamicina, kanamicina, trimetoprim, “*GenElute Bacterial Genomic DNA Kit*”.

Thermo Scientific (HyClone) (IL, EEUU): PBS 1x, Qubit.

2.2 Cepas bacterianas

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en esta tesis.

Cepa	Característica	Fuente de referencia
S. Typhimurium 14028s	Cepa silvestre virulenta	Jarvik <i>et al.</i> , 2010
$\Delta aroA$	14028s $\Delta aroA::Tmp$	Colección del laboratorio
$\Delta phoN$	14028s $\Delta phoN::Cam$	Colección del laboratorio
$\Delta phoPQ$	14028s $\Delta phoPQ::Kan$	Colección del laboratorio
$\Delta invA$	14028s $\Delta invA::Kan$	Colección del laboratorio
$\Delta ssaD$	14028s $\Delta ssaD::Kan$	Colección del laboratorio
<i>Escherichia coli</i> B/r (DBS0348878)	Cepa silvestre	Dictybase
<i>Klebsiella aerogenes</i> (DBS0349838)	Cepa silvestre	Dictybase

Colección de mutantes en genes individuales de *Salmonella* Typhimurium 14028s

En colaboración con los laboratorios del Dr. Michael McClelland y la Dra. Helene Andrews-Polymeris, hemos trabajado en la construcción de una colección de mutantes para cada uno de los genes de *S. Typhimurium* 14028s mediante una modificación del método de intercambio alélico por recombinación con productos de PCR descrito por Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner, 2000; Santiviago *et al.*, 2009). Estas mutantes individuales contienen un *cassette* de resistencia a Kan (Kan^R) en reemplazo del gen blanco de la deleción. La generación de las primeras ~1000 mutantes y su caracterización mediante métodos moleculares se realizó durante la pasantía postdoctoral del Dr. Carlos A. Santiviago en el laboratorio del Dr. McClelland (Santiviago *et al.*, 2009). Desde entonces, nuestro laboratorio ha construido más de 500 mutantes que se han incorporado a la colección mencionada. Como resultado de este esfuerzo común, actualmente la colección posee ~3690 mutantes individuales que representan un cobertura cercana al 80% de los genes no esenciales de *S. Typhimurium* 14028s (Porwollik *et al.*, 2014). La mezcla de cultivos individuales de cada una de estas mutantes permitió generar la genoteca *Single-gene deletion Kan^R* (SGD-K), que se utilizó en los análisis a

escala genómica que permitieron identificar mutantes con defectos en su capacidad de sobrevivir en *Dictyostelium*.

2.3 Líneas celulares

Tabla 2. Líneas celulares utilizadas en esta tesis.

Líneas celulares	Característica	Fuente de referencia
<i>Dictyostelium discoideum</i> AX4 (DBS0302402)	Cepa axénica (<i>axeA1</i> , <i>axeB1</i> , <i>axeC1</i>)	Dictybase

2.4 Medios y condiciones de cultivo bacteriano

Las bacterias se cultivaron rutinariamente a 37°C en caldo Luria-Bertani (LB) (10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de cloruro de sodio) con agitación durante toda la noche. Para los cultivos en medio sólido, el medio LB se suplementó con 15 g/L de Bacto agar. Cuando se requirió, el medio se suplementó con los antibióticos ampicilina (Amp 100 µg/mL), kanamicina (Kan 75 µg/mL), estreptomina (Str 300 µg/mL), trimetoprim (Tmp 25 µg/mL) y cloranfenicol (Cam 20 µg/mL).

2.5 Medios y condiciones de cultivo celular

La cepa AX4 de *Dictyostelium discoideum* se cultivó inicialmente a 23°C sobre un césped de *K. aerogenes* crecido en placas de agar SM (10 g/L de glucosa, 10 g/L de peptona, 1 g/L de extracto de levadura, 1 g/L de MgSO₄*7H₂O, 1,9 g/L de KH₂PO₄, 0,6 g/L de K₂HPO₄, 20 g/L de Bacto agar, pH 6,4) y posteriormente tratado con UV. Posteriormente, las amebas se crecieron en cultivos líquidos en condiciones axénicas con agitación a 23°C en medio HL5 (14 g/L de triptona, 7 g/L de extracto de levadura, 0,35 g/L de Na₂HPO₄, 1,2 g/L de KH₂PO₄ y 14 g/L de glucosa, pH 6,3) suplementado con Str y Amp. Luego del primer subcultivo, el medio se suplementó sólo con Amp. La densidad de los subcultivos se controló mediante la determinación de la densidad óptica (DO) a 350 nm y 600 nm, o mediante dilución en azul de tripán y posterior conteo en cámara de Neubauer.

Los subcultivos siempre se realizaron con células en fase exponencial temprana (1 a 2×10^6 células/mL). Para los ensayos de fagocitosis siempre se utilizaron células provenientes del 3^{er} al 5^o subcultivo en medio HL5.

2.6 Partidores

Tabla 3. Partidores utilizados en esta tesis.

Nombre	Secuencia
Adapter CG-end	CGAGATCGGAAGAGCp
Illumina_Index_CAAGGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGATCTGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCT
PCR Primer 2.0	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT
Illumina_multiplex-forward	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT
SGD Index_7nt_2	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAAGAGGAGACCTAAGGAGGATATTCA
SGD Index_7nt_8	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGCGGAGACCTAAGGAGGATATTCA
SGD Index_7nt_12	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAGCCGGAGACCTAAGGAGGATATTCA
SGD Index_7nt_13	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAGTAGGAGACCTAAGGAGGATATTCA
SGD Index_7nt_34	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCAACGGAGACCTAAGGAGGATATTCA
SGD Index_7nt_35	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCCAAGGAGACCTAAGGAGGATATTCA
SGD Index_7nt_47	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTGCGGAGACCTAAGGAGGATATTCA
SGD Index_7nt_52	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGGAAGGAGACCTAAGGAGGATATTCA
SGD Index_7nt_58	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTCCGGAGACCTAAGGAGGATATTCA
SGD Index_7nt_60	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTTAGGAGACCTAAGGAGGATATTCA
SGD Index_7nt_63	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTCATGGAGACCTAAGGAGGATATTCA
SGD Index_7nt_69	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTCTGGAGACCTAAGGAGGATATTCA
SGD 5'end code_2	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAGGAGTCTCGAAGCAGCTCCAGCCTG
SGD 5'end code_3	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAGGATCTCGAAGCAGCTCCAGCCTG
SGD 5'end code_4	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAAAGTCCCGAAGCAGCTCCAGCCTG
SGD 5'end code_5	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTATGGATCTTGAAGCAGCTCCAGCCT
SGD 5'end code_6	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACTAGCTTCGAAGCAGCTCCAGCCTG
SGD 5'end code_7	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGAACCCCGAAGCAGCTCCAGCCTG
SGD 5'end code_8	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGAGGCTTCGAAGCAGCTCCAGCCTG
SGD 5'end code_9	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGGAATTCGAAGCAGCTCCAGCCTG
SGD 5'end code_11	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTAACCTCGAAGCAGCTCCAGCCTG
SGD 5'end code_12	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGAAGTCCCGAAGCAGCTCCAGCCTG
SGD 5'end code_13	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCAGAACCTCGAAGCAGCTCCAGCCTG
SGD 5'end code_14	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCGGAGCTTGAAGCAGCTCCAGCCTG

2.7 Ensayos de fagocitosis

2.7.1 Condiciones generales

Las bacterias se crecieron durante toda la noche a 37°C con agitación. Previo a los ensayos, las bacterias se lavaron dos veces en solución amortiguadora Soerensen (0,017 M Na₂HPO₄, pH 6). Para los ensayos se usaron células de *D. discoideum* obtenidas desde el 3^{er} al 5^o subcultivo para asegurar condiciones axénicas. Las amebas se lavaron y resuspendieron en solución amortiguadora Soerensen previo a los ensayos.

2.7.2 Ensayos de coincubación

Se incubaron 2×10^7 células de *D. discoideum* a 23°C con agitación (150 rpm) junto a *Salmonella* usando una multiplicidad de infección (MOI) de 10, 100 y 1000 bacterias/célula en un volumen final de 20 mL de solución amortiguadora Soerensen. Se tomaron alícuotas del cultivo a diferentes tiempos de infección (0, 0.5, 1, 3 y 24 horas), las que se diluyeron 10 veces en solución amortiguadora Soerensen frío suplementada con azida de sodio al 0,2%. Luego de una centrifugación a 200 x g durante 5 min, las amebas se lavaron nuevamente con la misma solución amortiguadora y se lisaron agregando solución amortiguadora 50 mM Na₂HPO₄ a pH 9,2 suplementada con Triton X-100 al 0,2% para liberar las bacterias intracelulares. Se tomó una alícuota de 10 µl del lisado y se sembró en triplicado en placas de LB agar. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C y al día siguiente se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC) para calcular el título de bacterias. Además, se determinó la población de amebas viables presentes en cada punto del ensayo mediante dilución en azul de tripán y posterior conteo en cámara de Neubauer.

2.7.3 Ensayos de preincubación

Las amebas (2×10^7 células) se coincubaron con agitación a 23°C durante 1 hora con bacterias usando una MOI de 100 bacterias/célula en un volumen final de 10 mL de solución amortiguadora Soerensen. Luego de la coincubación, se

realizaron tres lavados usando solución amortiguadora Soerensen para separar las amebas infectadas de las bacterias extracelulares. Las amebas se mantuvieron durante el resto del ensayo en agitación a 23°C en solución amortiguadora Soerensen o en solución amortiguadora Soerensen suplementada con 20 µg/mL Gen (**Coincubación con solución amortiguadora + 20 µg/mL Gen**). Para determinar la población de bacterias intracelulares, se tomó una alícuota del cultivo a diferentes tiempos de infección (0, 0.5, 1, 3 y 24 horas). Estas muestras no se trataron (**Total**) o fueron lavadas con solución amortiguadora Soerensen (**Lavadas con solución amortiguadora**) o solución amortiguadora Soerensen suplementada con 10 µg/mL Gen (**Lavado con solución amortiguadora + 10 µg/mL Gen**) (**Figura 3**) o 20 µg/mL Gen (**Lavado con solución amortiguadora + 20 µg/mL Gen**). Posteriormente, las amebas se lisaron con solución amortiguadora Soerensen suplementada con Triton X-100 al 0,2 % para liberar las bacterias intracelulares. Se tomó una alícuota de 10 µl del lisado y se sembró en triplicado en placas de agar. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C y al día siguiente se determinaron las UFC para calcular el título de bacterias. Además, se determinó la población de amebas viables presentes en cada punto del ensayo mediante dilución en azul de tripán y posterior conteo en cámara de Neubauer.

2.7.4 Expresión de los resultados

Las UFC intracelulares a los distintos tiempos se expresaron como valores relativos al tiempo 0:

$$UFC\ t=x / UFC\ t=0$$

La internalización se definió como el porcentaje de UFC intracelulares al tiempo 0 dividido el número de UFC totales en ese matraz:

$$\text{Internalización} = 100 \times \frac{UFC\ t = 0}{UFC\ \text{iniciales}}$$

La población de amebas viables se expresa como el número de células por mililitro (cel/mL).

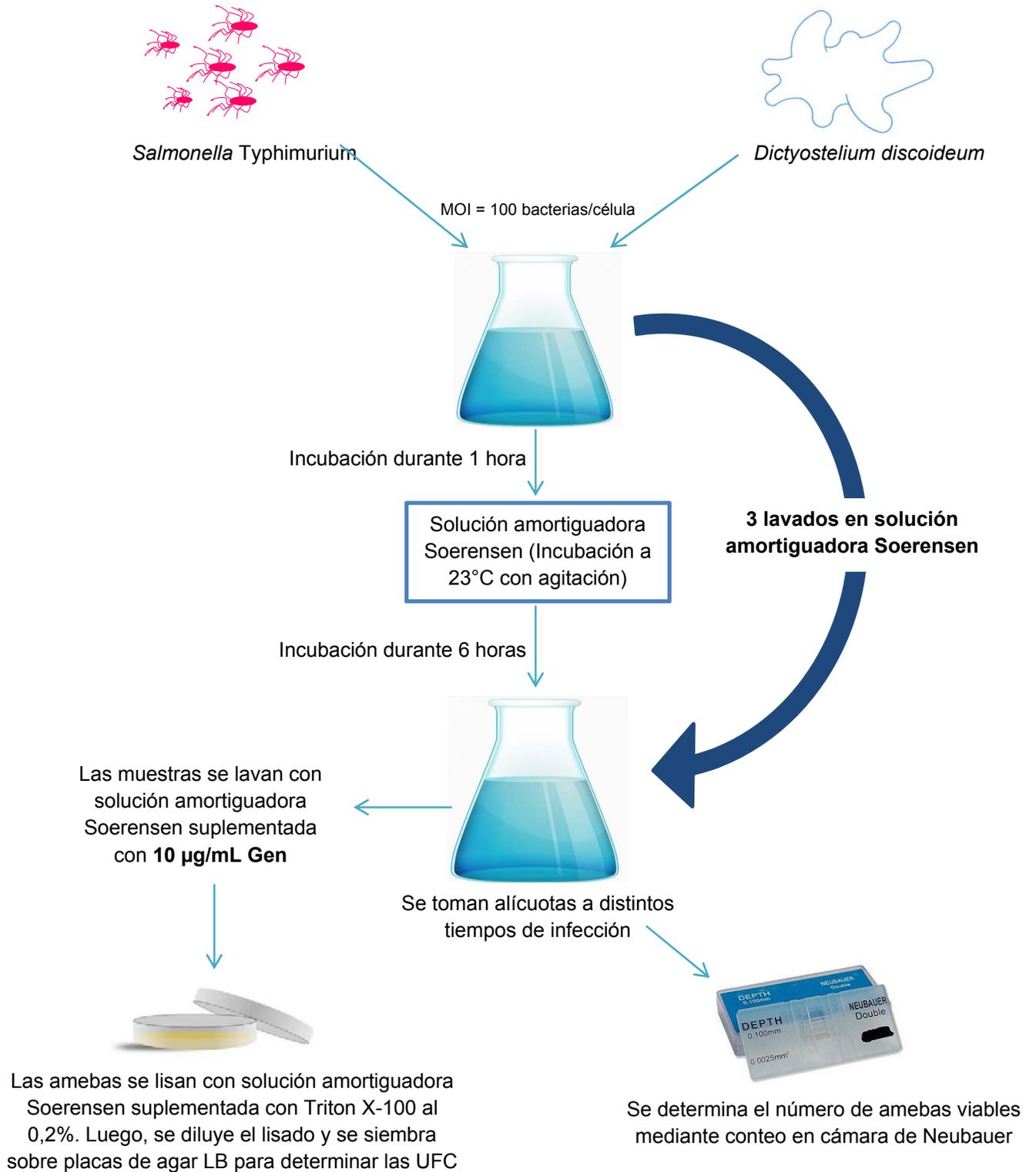


Figura 3.- Esquema del ensayo de preincubación

2.8 Ensayos de competencia

Las amebas (2×10^7 células) se infectaron usando una MOI de 150 bacterias/célula. En cada caso se utilizó una mezcla que contenía la cepa silvestre 14028s, la mutante atenuada $\Delta aroA$ como control interno y una segunda mutante de interés a evaluar. Las bacterias se lavaron en solución amortiguadora Soerensen y se coincubaron con las amebas durante 1 hora a 23°C en un volumen de 10 mL de solución amortiguadora Soerensen. Luego, se realizaron 3 lavados con solución amortiguadora Soerensen para separar las amebas infectadas de las bacterias extracelulares. Las amebas infectadas se resuspendieron en solución amortiguadora Soerensen y se mantuvieron con agitación a 23°C durante todo el ensayo. A los tiempos 0, 1, 3 y 6 horas post infección se tomaron alícuotas que fueron lavadas en solución amortiguadora Soerensen suplementada con 10 µg/mL Gen. Posteriormente, las amebas se lisaron con solución amortiguadora Soerensen suplementada con Triton X-100 al 0,2%. Se tomó una alícuota de los lisados obtenidos en cada tiempo y se sembraron en placas de agar LB y agar LB suplementadas con Kan, Tmp o Cam para seleccionar las distintas mutantes. Posteriormente, las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C y al día siguiente se realizó el conteo de las UFC y se calculó el título de bacterias. Además, se determinó la población de amebas viables presentes en cada punto del ensayo mediante dilución en azul de tripán y posterior conteo en cámara de Neubauer.

2.8.1 Expresión de los resultados

Los resultados de las UFC intracelulares de cada mutante a distintos tiempos de infección se expresaron como valores relativos a las UFC de la cepa silvestre como el Log_{10} del índice de competencia (IC), que se define como:

$$IC = \frac{UFC(t = X \text{ mutante})/UFC(t = X \text{ silvestre})}{UFC(t = 0 \text{ mutante})/UFC(t = 0 \text{ silvestre})}$$

De igual forma, la internalización de cada mutante se expresaron relativa a la cepa silvestre como el Log_{10} del IC, como lo indica la siguiente ecuación:

$$IC \text{ Internalización} = \frac{UFC (t = 0 \text{ mutante})/UFC \text{ iniciales mutante}}{UFC (t = 0 \text{ silvestre})/UFC \text{ iniciales silvestre}}$$

La población de amebas viables se expresó como el número de células por mililitro (cel/mL).

2.9 Análisis estadísticos de los datos de distintos ensayos de infección

Para el análisis de los datos de internalización, supervivencia intracelular y población de ameba se utilizó ANOVA de dos vías con test posterior de Fisher, comparando ya sea *E. coli* B/r o una mutantes particular de *S. Typhimurium* con la cepa silvestre 14028s.

Para el análisis de los datos de internalización y *fitness* obtenidos a partir de los ensayos de competencia se utilizó el test *t* de Student tomando un valor de $\text{Log}_{10} (IC) = 0$ como referencia. Este valor indica que la mutante se comporta igual que la cepa silvestre en el sistema experimental.

2.10 Infección usando la genoteca de mutantes SGD-K de *S. Typhimurium* 14028s

La genoteca SGD-K de *S. Typhimurium* 14028s se creció en LB a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, las bacterias se lavaron con solución amortiguadora Soerensen previo a la infección.

Se realizaron ensayos de infección usando el protocolo de competencia descrito anteriormente, con algunas modificaciones. Las amebas (1 a 2×10^8 células) se coincubaron con la genoteca SGD-K durante 1 hora a 23°C usando una MOI de 100 bacterias/célula en un volumen final de 60 mL de solución amortiguadora Soerensen. Luego, se realizaron 3 lavados con solución amortiguadora Soerensen para separar las amebas infectadas de las bacterias extracelulares. Las amebas infectadas se resuspendieron en solución amortiguadora Soerensen y se mantuvieron con agitación a 23°C durante todo el ensayo. A los tiempos 0 y 6 horas post infección se tomaron 15 mL y 45 mL de cultivo, respectivamente, los que se lavaron en solución amortiguadora Soerensen suplementada con

10 µg/mL Gen. Posteriormente, las amebas se lisaron con solución amortiguadora Soerensen suplementada con Triton X-100 al 0,2%. Se tomó una alícuota de los lisados obtenidos a ambos tiempos de infección para calcular el título de bacterias intracelulares, como se describió anteriormente. Las bacterias intracelulares obtenidas al tiempo 0 y 6 horas del ensayo se incubaron durante toda la noche en 20 mL de LB a 37°C. Luego, las bacterias se centrifugaron a 3.000 x g durante 5 min y el sedimento se mantuvo a -20°C (muestra *output*) hasta su uso posterior.

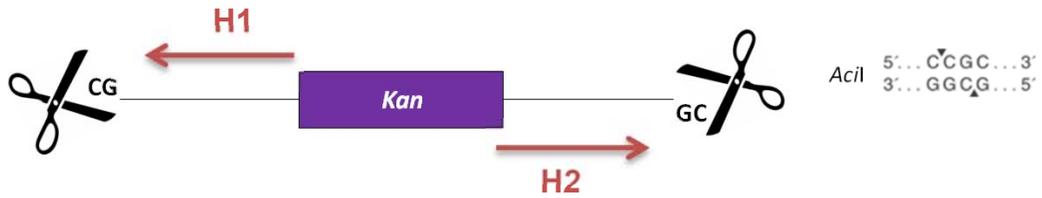
2.11 Generación de una genoteca para secuenciación masiva de DNA mediante el sistema *MiSeq* de Illumina

En nuestro laboratorio se generó un protocolo que permite amplificar las regiones adyacentes a la inserción del *cassette* de Kan^R presente en cada una de las mutantes de la genoteca SDG-K (**Figura 4**). Este protocolo nos permitió identificar las mutantes presentes en las poblaciones analizadas mediante secuenciación masiva de DNA utilizando el sistema *MiSeq* de Illumina. El análisis posterior de los datos de secuenciación permite identificar las mutantes bajo selección negativa en *D. discoideum*.

2.11.1 Extracción de DNA genómico

Se extrajo DNA genómico (gDNA) a partir del sedimento bacteriano obtenido de las distintas muestras utilizando el sistema comercial “*GenElute Bacterial Genomic DNA Kit*” de acuerdo al protocolo del fabricante. El gDNA se eluyó con H₂O libre de nucleasas (2 veces con 100 µL). Se midió la concentración y pureza (A_{260}/A_{280}) de las muestras de gDNA usando NanoDrop. Paralelamente, se analizaron alícuotas de 3 µl de cada muestra de gDNA mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en solución amortiguadora Tris-acetato-EDTA (TAE). Las muestras se mantuvieron a -20°C hasta su uso posterior.

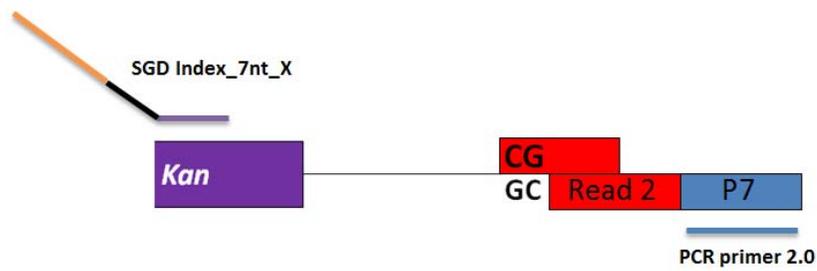
A. Digestión enzimática



B. Ligación



C. 1ª PCR



D. 2ª PCR



E. Producto final

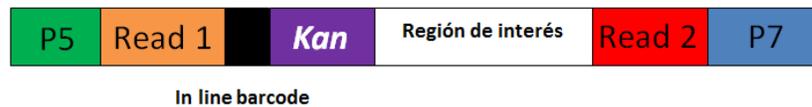


Figura 4.-Esquema de la generación de una genoteca para secuenciación de DNA mediante el sistema *MiSeq* de Illumina.

2.11.2 Digestión enzimática

Una alícuota que contenía 2 µg de gDNA de cada muestra a analizar se digirió con la enzima de restricción *Acil* (**Figura 4A**). Para esto, el gDNA se incubó con la enzima a 37°C durante 2 horas, de acuerdo al siguiente protocolo:

Tabla 4. Protocolo de digestión enzimática.

Reactivo	Volumen (µL)
gDNA (2 µg)	X
CutSmart® solución amortiguadora (10x)	6
<i>Acil</i> (10.000 U/mL)	0,5
H ₂ O	53,5-X
<i>Volumen Final</i>	60

2.11.3 Ligación

Se usó una alícuota de 30 µL de gDNA digerido con la enzima *Acil* en una reacción de ligación con un DNA adaptador generado a partir de una mezcla de los oligonucleótidos “Adapter CG-end” e “Illumina_Index_CAGATC”, que contiene las secuencias Read 2 y P5 de Illumina (**Figura 4B**), de acuerdo al siguiente protocolo:

Tabla 5. Protocolo de ligación.

Reactivo	Volumen (µL)
gDNA digerido (1 µg)	30
ATP (10 µM)	4
Oligonucleótido Adapter CG-end (10mM)	2
Oligonucleótido Illumina_Index_CAAGGT (10mM)	2
T4 DNA ligasa (200.000 U/mL)	1
H ₂ O	1
<i>Volumen Final</i>	40

Las ligaciones se sometieron a ciclos de distintas temperaturas en un termociclador, según el siguiente protocolo:

Tabla 6. Temperaturas de ligación.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)
25	90
10	90
16	∞

Luego de la etapa de ligación, las muestras se mantuvieron a 95°C durante 5 min para inactivar las enzimas presentes en la mezcla. Los productos de ligación se purificaron usando el sistema comercial “*QIAquick PCR Product Purification Kit*” de acuerdo al protocolo del fabricante. Se analizó una alícuota de 3 µL del gDNA digerido y posteriormente ligado mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% en solución amortiguadora TAE. El resto de la muestra se mantuvo a -20°C hasta su uso posterior.

2.11.4 Amplificación de fragmentos mediante PCR

La amplificación mediante PCR se llevó a cabo usando DNA polimerasa *Taq* ocupando como templado una alícuota del producto de ligación, con la finalidad de aumentar la abundancia de los fragmentos de interés. Para la amplificación se realizó una mezcla de reacción de acuerdo al siguiente protocolo:

Tabla 7. Protocolo de amplificación para la primera PCR.

Reactivo	Volumen (µL)
DNA digeridos y ligados	12
Partidor PCR primer 2.0 (10 µM)	2
Partidor SGD Index_7nt_X o SGD 5' end code_X (10 µM)	2
10x dNTPs (2 mM de cada uno)	5
MgCl ₂ (25 mM)	3
Solución amortiguadora (10x)	5
DNA polimerasa <i>Taq</i> (5 U/µL)	0,5
H ₂ O	20,5
Volumen Final	50

El partidor “PCR primer 2.0” hibrida con la secuencia del adaptador ligado al gDNA digerido con *Acil*. Los partidores de la serie “SGD Index_7nt_X” hibridan en el

extremo 3' del *cassette* de Kan^R presente en cada mutante. De manera alternativa, el partidador “PCR primer 2.0” se usó junto con partidores de la serie “SGD 5' end code_X”, que hibridan en el extremo 5' del *cassette* de Kan^R. Los partidores de las series “SGD Index_7nt_X” y “SGD 5' end code_X” (**Tabla 3**) contienen una región variable (“*in-line barcode*”) que permite la identificación de cada muestra mediante secuenciación (**Figura 4C**). La amplificación se realizó de acuerdo al siguiente protocolo:

Tabla 8. Temperaturas de amplificación para la primera PCR.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)
95	1
95	0,5
60	0,5
72	0,5
72	2
20	∞

} 10 ciclos

Luego de la amplificación, se purificaron los productos de PCR usando el sistema comercial “*QIAquick PCR Product Purification Kit*” de acuerdo al protocolo del fabricante. Posteriormente, se realizó una segunda amplificación mediante PCR utilizando como molde los productos de la primera PCR. Para la amplificación se realizó una mezcla de reacción de acuerdo al siguiente protocolo:

Tabla 9. Protocolo de amplificación para la segunda PCR.

Reactivo	Volumen (µL)
Producto del primer PCR	1
Partidor PCR primer 2.0 (10 µM)	2
Partidor Illumina_multiplex-forward (5 µM)	4
10x dNTPs (2 mM de cada uno)	5
MgCl ₂ (25 mM)	3
Solución amortiguadora (10x)	5
DNA polimerasa <i>Taq</i> (5 U/µL)	0,5
H ₂ O	29,5
Volumen Final	50

Se utilizaron los partidores “PCR primer 2.0” y el partidore “illumina_multiplex-forward”. Este último hibrida con la región 5’ de los partidores “SGD Index_7nt_X” y “SGD 5’ end code_X”, lo que permite agregar a los productos de amplificación la secuencia P5, necesaria para la secuenciación (Figura 4D). La amplificación se realizó de acuerdo al siguiente protocolo:

Tabla 10. Temperaturas de amplificación para la segunda PCR.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)
95	1
95	0,5
60	0,5
72	0,5
72	2
20	∞

} 13 ciclos

2.11.5 Purificación desde gel de agarosa

El DNA amplificado se purificó desde un gel de agarosa al 2% en solución amortiguadora TAE usando el sistema comercial “QIAquick Gel Extraction Kit” de acuerdo al protocolo del fabricante. Este paso se realizó para eliminar un producto de ~80 pb que resultó a partir de la amplificación entre los partidores. Luego de la purificación, se analizó una alícuota de 3 µL del producto de PCR mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% en solución amortiguadora TAE para verificar la eliminación de la banda contaminante. El resto de la muestra purificada se mantuvo a -20°C hasta su uso posterior.

2.12 Secuenciación masiva de DNA

Se cuantificó la concentración de DNA mediante un método fluorimétrico utilizando el sistema comercial *Qubit*. Posteriormente, se determinó la distribución de tamaños de los fragmentos de las genotecas de secuenciación mediante electroforesis capilar utilizando el sistema *Fragment Analyzer*. Con los datos obtenidos, se calculó la molaridad de cada muestra, lo que permitió generar una mezcla equimolar de todas las genotecas. Esta mezcla se secuenció utilizando el

sistema comercial “*MiSeq Reagent Kit v3*” durante 75 ciclos en un equipo *MiSeq*. El servicio de secuenciación se realizó a través de una colaboración con el equipo del Dr. Víctor Martínez, académico del Departamento de Fomento de la Producción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

2.12.1 Análisis de los datos de secuenciación

Las lecturas obtenidas para cada mutante fueron normalizadas por el número total de lecturas asociadas a alguna mutante (i.e. “mapeadas”) para cada condición experimental. Luego, se determinó el promedio de los valores normalizados correspondientes al tiempo 0 y 6 (T0 y T6, respectivamente). Se calculó el cociente T6/T0 como la razón entre el promedio de los 3 valores obtenidos para T6 divididos por el promedio de los valores del T0 para cada mutante. Este procedimiento se realizó para los datos de secuenciación obtenidos a partir de la amplificación de ambos extremos de cada mutante (H1 y H2). Se consideró “bajo selección negativa” a aquellas mutantes que presentaron valores de $T6/T0 \leq 0,5$ ($\text{Log}_{10} 0,5 = -0,3010$).

Se usó el test *t* de Student para comparar las diferencias entre el promedio de las lecturas normalizadas del T6 y el promedio de las lecturas normalizadas del T0 para cada mutante. Se consideró que un valor de $T6/T0 \leq 0,5$ era estadísticamente significativo cuando estaba asociado a un valor de $P < 0,05$.

3.- RESULTADOS

3.1 Evaluación de la capacidad infectiva de *Salmonella* Typhimurium en *Dictyostelium discoideum* bajo distintas condiciones experimentales

La interacción entre *Salmonella* Typhimurium y *Dictyostelium discoideum* no ha sido caracterizada en detalle. Además, en la literatura existen reportes contradictorios respecto a esta interacción que han sido generados a partir de distintos protocolos usados para evaluar la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en esta ameba.

En vista de esta situación, decidimos caracterizar la interacción de *S. Typhimurium* 14028s con *D. discoideum* AX4 usando como control a *E. coli* B/r, bacteria comúnmente usada como alimento de la ameba durante su crecimiento en medio sólido. Para esto, se desarrolló un ensayo de fagocitosis adaptando un protocolo descrito anteriormente (Sillo *et al.*, 2011). Brevemente, este ensayo consistió en coincubar la ameba durante todo el tiempo de infección con *S. Typhimurium* 14028s o *E. coli* B/r en matraces independientes, utilizando una MOI de 100 bacterias/célula. Posteriormente, se realizaron lavados con solución amortiguadora Soerensen suplementada con azida de sodio y se determinó en cada caso el número de bacterias intracelulares (**Figura 5A**) y la población de amebas viables (**Figura 5B**). Este ensayo se describe en la sección 2.7.2 de Materiales y Métodos como el “ensayo de coincubación”. Paralelamente, se realizó un ensayo de coincubación utilizando una MOI de 1000 bacterias/célula para observar variaciones en la población de amebas infectadas (**Figura 6**). En este caso no se determinó la población de bacterias intracelulares.

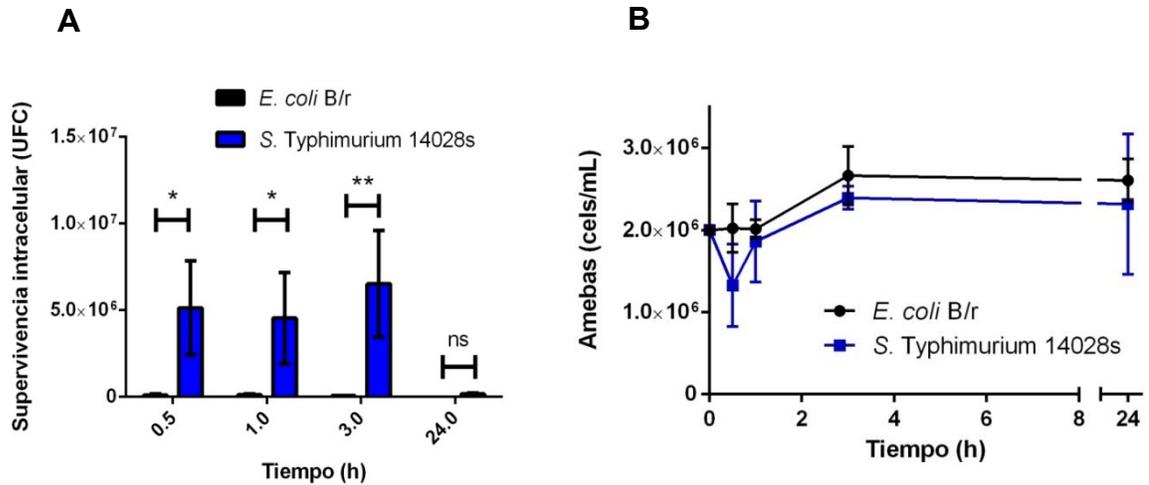


Figura 5.- Ensayo de coincubación usando una MOI de 100 bacterias/célula. En la figura **A** se muestra las UFC intracelulares a los distintos tiempos de ensayo. La figura **B** muestra el número de amebas viables coincubadas con *E. coli* B/r (negro) o *S. Typhimurium* 14028s (azul) a distintos tiempos de infección. Los valores graficados corresponden al promedio de 3 ensayos ± SEM. Para los análisis estadísticos se utilizó ANOVA de dos vías con el post test de Fisher (* P < 0,05; ** P < 0,01).

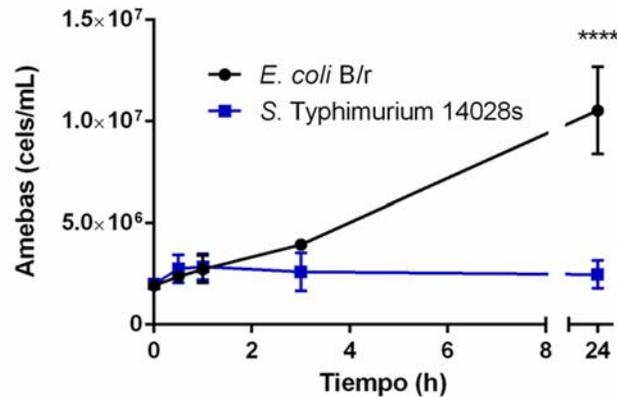


Figura 6.- Ensayo de coincubación usando una MOI de 1000 bacterias/célula. En el gráfico se muestra el número de amebas viables coincubadas con *E. coli* B/r (negro) o *S. Typhimurium* 14028s (azul) a distintos tiempos de infección. Los valores graficados corresponden al promedio de 3 ensayos ± SEM. Para los análisis estadísticos se utilizó ANOVA de dos vías con el post test de Fisher (**** P < 0,0001).

Al utilizar una MOI de 1000 bacterias/célula en el ensayo de coincubación se observó que, a diferencia de *E. coli* B/r, *S. Typhimurium* no es degradada por la ameba durante los ensayos de infección (**Figura 5A**). Además, luego de 24 horas de coincubación la población de amebas infectada con *E. coli* B/r o *S. Typhimurium* no varía conforme pasa el tiempo y se mantiene cercana al número inoculado al comienzo del ensayo (**Figura 5B**).

Por otra parte, al utilizar una MOI de 1000 bacterias/célula se observó que la población de amebas es capaz de aumentar cuando *E. coli* B/r está disponible en el medio, alcanzando incluso 5 veces la densidad de población observada a las 24 horas en el cocultivo en presencia de *S. Typhimurium* (**Figura 6**).

Posteriormente, se llevaron a cabo ensayos de fagocitosis para comparar la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* y *E. coli* B/r usando los mismos valores de MOI, pero esta vez mediante una aproximación experimental distinta (**Figura 7**). Brevemente, la infección se mantuvo durante 1 hora y luego se realizaron lavados con solución amortiguadora Soerensen y se mantuvieron las amebas infectadas durante 24 horas luego de los lavados realizados. Este ensayo se describe en la sección 2.7.3 de Materiales y Métodos como el “ensayo de preincubación”.

En los ensayos de preincubación usando MOIs de 100 y 1000 bacterias/célula se observaron diferencias en los títulos de bacterias intracelulares de *S. Typhimurium* con respecto a *E. coli* B/r, principalmente a 3 y 24 horas de infección donde se observaron diferencias en ambos ensayos (**Figura 7**). Por otra parte, en ambos casos se observó un aumento de la población de amebas infectadas con *E. coli* B/r en comparación con la población de amebas infectadas con *S. Typhimurium* 14028s.

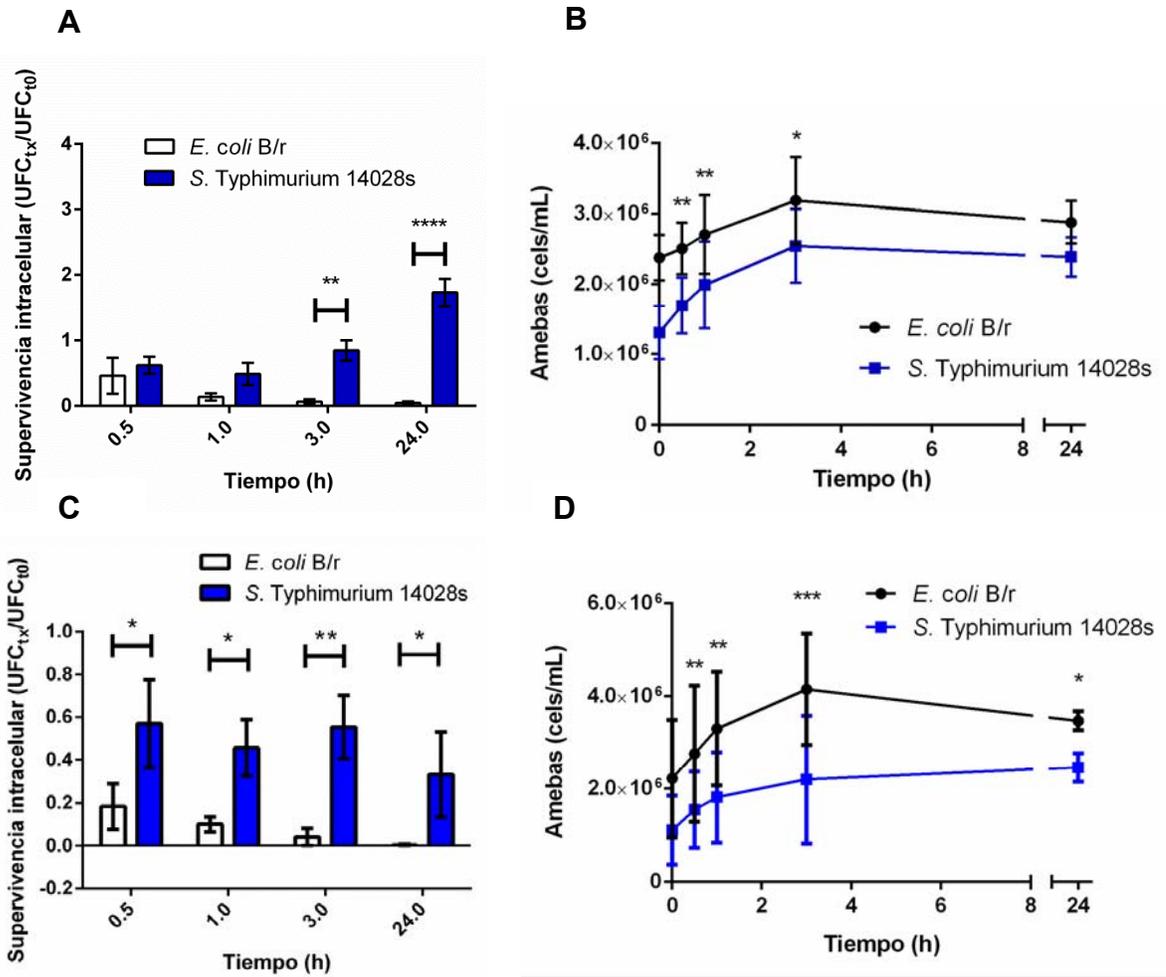


Figura 7.- Ensayo de preincubación usando MOIs de 100 y 1000 bacterias/célula. Los gráficos **A** y **B** corresponden a infecciones con una MOI de 100 bacterias/célula, mientras que **C** y **D** corresponden a infecciones con una MOI de 1000 bacterias/célula. Las figuras **A** y **C** muestran valores de UFC intracelulares normalizadas por las UFC al tiempo 0. Las figuras **B** y **D** muestran el número de amebas viables incubadas con *E. coli* B/r (negro) o *S. Typhimurium* 14028s (azul) a distintos tiempos de infección. Los valores graficados corresponden al promedio de 3 ensayos ± SEM. Para los análisis estadísticos se utilizó ANOVA de dos vías con el post test de Fisher (* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,005; **** P < 0,0001).

3.2 Estandarización del ensayo de fagocitosis

Luego de desarrollar nuestro ensayo de preincubación, se realizó una estandarización de las condiciones particulares de lavado de las muestras obtenidas a los diferentes tiempos, evaluando el uso de Gen. Para esto, se realizaron ensayos de preincubación usando una MOI de 100 bacterias/célula y las muestras recibieron distintos tratamientos para determinar la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium*. Brevemente, este ensayo de preincubación modificado consistió en incubar durante 1 hora las amebas junto a *S. Typhimurium* en solución amortiguadora Soerensen. Luego de la infección, se realizó una centrifugación para separar las bacterias extracelulares de las amebas infectadas, las que se mantuvieron en solución amortiguadora Soerensen durante el tiempo de ensayo (**Figura 8**). Para obtener cada punto a evaluar en el ensayo, las células: (i) no recibieron tratamiento (**Total**), (ii) se lavaron con solución amortiguadora Soerensen (**Lavadas con solución amortiguadora**), (iii) se lavaron con solución amortiguadora Soerensen suplementada con 10 µg/mL Gen (**Lavado con solución amortiguadora + 10 µg/mL Gen**), (iv) se lavaron con solución amortiguadora Soerensen suplementada con 20 µg/mL Gen (**Lavado con solución amortiguadora + 20 µg/mL Gen**), o (v) se mantuvieron todo el tiempo en solución amortiguadora Soerensen suplementada con 20 µg/mL Gen (**Coincubación con solución amortiguadora + 20 µg/mL Gen**). Finalmente, para cada ensayo se determinaron las UFC intracelulares (**Figura 8A**) y la población de amebas viables (**Figura 8B**).

No se observaron diferencias entre los valores de UFC intracelulares obtenidos de ensayos en los que no se realizaron lavados y en los que se realizaron lavados sólo con solución amortiguadora Soerensen (**Figura 8A**). Sin embargo, se observó una disminución de las UFC intracelulares al realizar lavados con solución amortiguadora Soerensen con 10 o 20 µg/mL Gen. Por otra parte, se observó que todas las bacterias intracelulares fueron eliminadas a las 6 horas de infección al mantener las amebas infectadas en solución amortiguadora Soerensen con 20 µg/mL Gen durante todo el ensayo (**Figura 8A**). Cabe mencionar que ninguno

de los tratamientos modificó la población de amebas viables en el ensayo (**Figura 8B**). Tomando en cuenta todos estos resultados, se consideró el protocolo de preincubación realizando lavados con solución amortiguadora Soerensen suplementada con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Gen como el ensayo más eficaz para determinar la población de bacterias intracelulares.

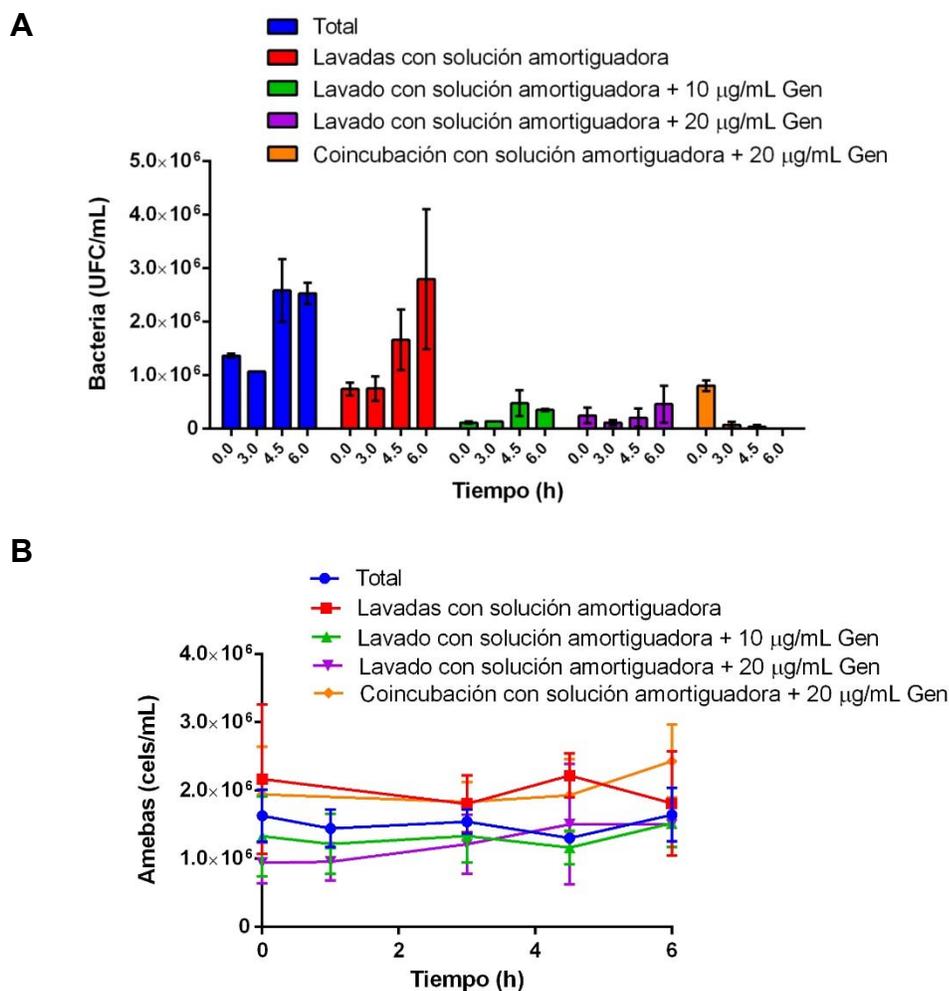


Figura 8.- Comparación de distintos protocolos para evaluar la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*. En la figura **A** se muestra el título de bacterias a distintos tiempos de infección. La figura **B** muestra el número de amebas viables a diferentes tiempos de infección. Los valores graficados corresponden al promedio de al menos 2 ensayos \pm SEM.

3.3 Evaluación de la participación de algunos genes asociados con patogenicidad en otros modelos de infección en la supervivencia de *Salmonella Typhimurium* en *Dictyostelium discoideum*

Utilizando las condiciones experimentales establecidas anteriormente, se realizaron ensayos de fagocitosis en los que se infectó a *D. discoideum* con mutantes de *S. Typhimurium* 14028s generadas por intercambio alélico utilizando un *cassette* de Kan^R. En estos ensayos se comparó la supervivencia intracelular de cada mutante con la presentada por la cepa silvestre parental. Se utilizaron 4 mutantes definidas, 3 de ellas en genes de virulencia de *S. Typhimurium*: *invA*, *ssaD* y *phoPQ*. Los dos primeros genes codifican proteínas estructurales de los T3SS codificados en SPI-1 y SPI-2, respectivamente. Por su parte, los genes *phoP* y *phoQ* codifican un sistema de dos componentes que regula la expresión de muchos genes de virulencia de *S. Typhimurium*, incluyendo algunos codificados en la SPI-2. Además de estos genes de virulencia se utilizó una mutante en el gen *aroA*, que codifica una proteína que participa en la vía de síntesis de compuestos aromáticos. Se ha demostrado que la delección del gen *aroA* provoca un efecto pleiotrópico en la bacteria que le impide sobrevivir intracelularmente y colonizar a sus hospederos.

Las amebas se incubaron con *S. Typhimurium* 14028s o cada una de las mutantes en matraces independientes utilizando una MOI de 100 bacterias/célula. En cada caso se determinó el porcentaje de internalización (**Figura 9A**), que se definió como el porcentaje de bacterias que ingresó en las amebas luego de una hora de infección. Posteriormente, en cada caso se determinó las UFC intracelulares (**Figura 9B**) y la población de amebas viables (**Figura 9C**).

Como se muestra en la **Figura 9**, no se observaron diferencias en el porcentaje de internalización de las distintas mutantes evaluadas. Por otra parte, se observó que la mutante $\Delta invA$ es capaz de sobrevivir más que la cepa silvestre a todos los tiempos de ensayo. A las 6 horas de infección se observó una disminución de la supervivencia de las mutantes $\Delta aroA$ y $\Delta phoPQ$ con respecto a la cepa silvestre. Por su parte, las mutantes $\Delta ssaD$ y $\Delta invA$ mostraron un aumento en su

supervivencia intracelular con respecto a la cepa silvestre a las 6 horas de infección. No se observó un efecto de las bacterias en la población de amebas viables determinadas en cada ensayo. Cabe mencionar que los resultados obtenidos con estos ensayos presentaron una gran dispersión de valores entre las réplicas biológicas. Además, fueron difíciles de interpretar debido a que no parecían tener sentido biológico en comparación a lo observado en otros modelos.

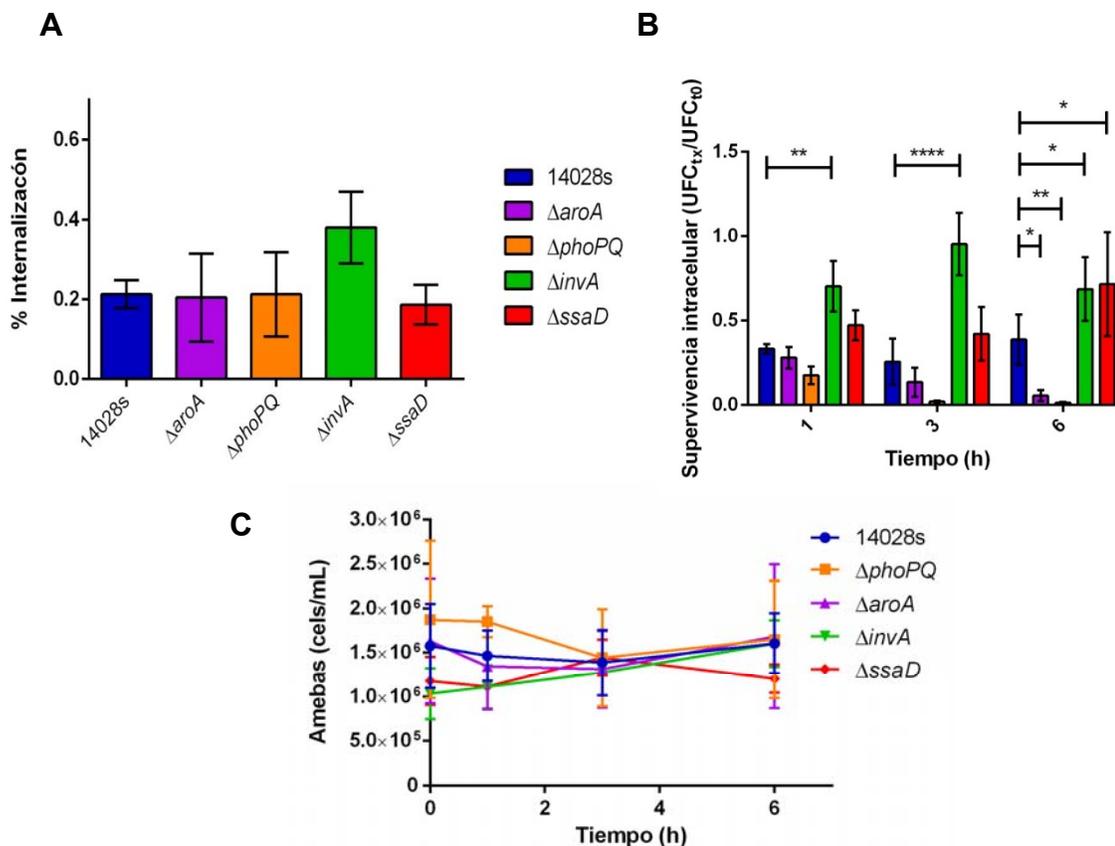


Figura 9.- Ensayos de infección simple. La figura **A** muestra el porcentaje de UFC al tiempo 0, dividido por el inóculo inicial de bacterias. La figura **B** muestra el recuento de UFC intracelulares, dividido por el número de bacterias intracelulares al T0. La figura **C** muestra las poblaciones de amebas viables presentes en los distintos matraces de infección. Todos los valores graficados corresponden al promedio de 3 ensayos \pm la SEM. Para los análisis estadísticos se utilizó ANOVA de dos vías con el post test de Fisher (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$).

3.4 Ensayos de competencia

Luego de realizar ensayos en los que se evaluó individualmente distintas cepas de *S. Typhimurium*, se realizaron ensayos de competencia en los que se evaluó la cepa silvestre junto a dos o más mutantes definidas infectando una misma población de amebas. Este tipo de ensayos ofrece ciertas ventajas con respecto a un ensayo de infección simple. Como las distintas bacterias están sometidas a un mismo microambiente, se logra disminuir la variabilidad intrínseca de los ensayos simples y se facilita la comparación directa de cada mutante mientras compite por sobrevivir intracelularmente con la cepa silvestre en cada ensayo. Además, los ensayos de competencia constituyen un primer acercamiento al posterior análisis de una mezcla compleja de mutantes, como la SGD-K.

Los ensayos de competencia se realizaron usando el protocolo de preincubación que incluyen lavados con solución amortiguadora Soerensen suplementada con 10 µg/mL Gen, con algunas modificaciones. En este caso, se usó una MOI de 150 bacterias/célula y las bacterias usadas para las infecciones se mezclaron en iguales proporciones. Así, en cada matraz se agregó una mezcla que contenía la cepa silvestre, la mutante $\Delta aroA$ y una de las mutantes en genes relacionados con la virulencia de *Salmonella* ($\Delta invA$, $\Delta ssaD$ o $\Delta phoPQ$). Además, se realizaron ensayos de competencia donde se evaluó la mutante $\Delta phoN$, que se comporta de manera similar a la cepa silvestre en otros modelos de infección.

Luego de una hora de infección se observó una mayor internalización de las mutantes $\Delta invA$ y $\Delta ssaD$ en comparación con la cepa silvestre (**Figura 10A**). Por otra parte, se observó que la mutante $\Delta ssaD$ presenta problemas de supervivencia intracelular luego de 1 hora de infección en comparación a la cepa silvestre, mientras que las mutantes $\Delta invA$ y $\Delta aroA$ presentan problemas de supervivencia a las 6 horas de infección (**Figura 10B**). Además, no se observaron diferencias significativas entre la supervivencia intracelular de la cepa silvestre y las mutantes $\Delta phoPQ$ y $\Delta phoN$ durante todo el ensayo (**Figura 10B**). Finalmente, no se observó que la población de amebas se viera afectada durante el ensayo (**Figura 10C**).

En conjunto, nuestros resultados indican que los ensayos de competencia permiten determinar diferencias de supervivencia intracelular de distintas mutantes que nos debiera permitir una identificación a escala genómica del repertorio de genes que *S. Typhimurium* requeridos para sobrevivir al interior de *D. discoideum*.

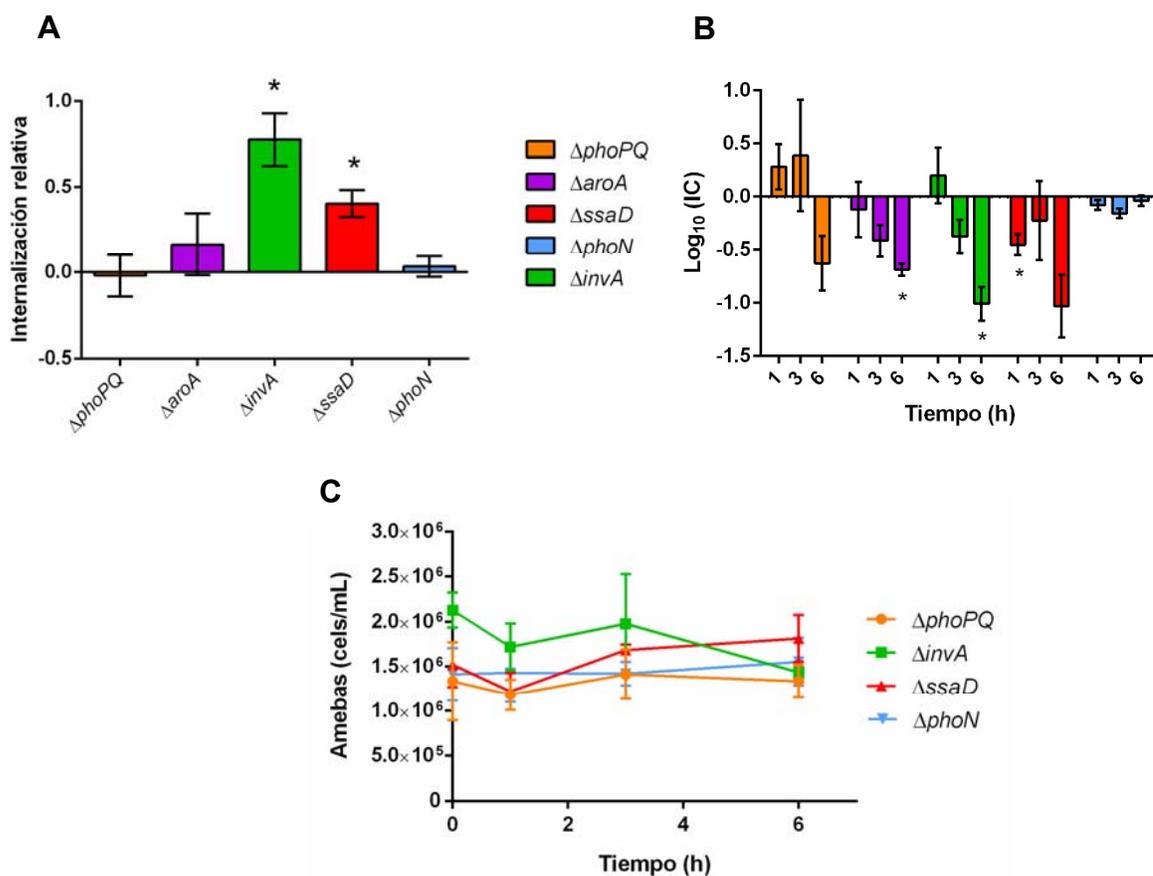


Figura 10.- Ensayos de competencia. La figura **A** muestra la internalización de cada mutante relativa a la cepa silvestre. La figura **B** muestra valores expresados como el Log₁₀ del Índice de Competencia. La figura **C** muestra las amebas viables presentes en los distintos matraces de infección. Todos los valores graficados corresponden al promedio de 3 ensayos ± SEM. Para los análisis estadísticos se utilizó el test *t* de Student (* *P* < 0,05).

3.5 Identificación a escala genómica de los genes de *Salmonella* Typhimurium involucrados en la supervivencia intracelular en *Dictyostelium discoideum*

Se realizaron infecciones usando el protocolo de los ensayos de competencia descrito anteriormente, con algunas modificaciones. En este caso, en lugar de mutantes individuales de *S. Typhimurium* se usó la genoteca de mutantes SGD-K. Para esto, el ensayo se realizó en un volumen total de 60 mL de solución amortiguadora Soerensen con $\sim 2 \times 10^8$ amebas. Se escaló el volumen del ensayo con el objetivo de obtener una cobertura de al menos 10 veces la complejidad de la genoteca (3690 mutantes distintas). La cobertura corresponde al número de veces que la complejidad total de una genoteca está contenida en un experimento.

A partir de estos ensayos se recuperaron las bacterias intracelulares presentes en las amebas al tiempo 0 y 6 horas, como se describe en la sección 2.10 de Materiales y Métodos. Las bacterias recuperadas se crecieron durante toda la noche en 20 mL de LB y al día siguiente se les extrajo gDNA. Estas muestras de gDNA son representativas de la población de mutantes presentes en el interior de las amebas a los distintos tiempos de infección evaluados. Este experimento se realizó 3 veces de forma independiente (3 réplicas biológicas). Los datos referentes a cada réplica se presentan en la **Tabla 11**.

Tabla 11.- Datos de infección de *D. discoideum* usando la SGD-K.

Réplica	MOI	Tiempo	UFC totales recuperadas	Cobertura
1	56	T = 0	$6,75 \times 10^5$	182x
		T = 6	$4,95 \times 10^5$	134x
2	80	T = 0	$2,45 \times 10^6$	662x
		T = 6	$5,85 \times 10^5$	158x
3	55	T = 0	$2,40 \times 10^6$	649x
		T = 6	$5,55 \times 10^5$	150x

En la tabla se muestran valores de MOI obtenidos en cada ensayo, las UFC totales recuperadas en cada muestra (T = 0 y T = 6) y las coberturas obtenidas en cada condición evaluada.

3.6 Generación de las genotecas para secuenciación de DNA mediante el sistema *MiSeq* de Illumina

Para evaluar cómo se comportan las mutantes presentes en la genoteca de mutantes SGD-K al infectar *D. discoideum* fue necesario desarrollar un método que nos permitiera identificar cada una de las mutantes y su abundancia relativa en la población. Para esto, se generó un protocolo para amplificar las regiones adyacentes al *cassette* de Kan^R presente en cada mutante a partir del gDNA obtenido de las muestras recuperadas desde las amebas. Durante la amplificación se agregaron secuencias necesarias para identificar las mutantes mediante secuenciación masiva de DNA utilizando el sistema *MiSeq* de Illumina (**Figura 4**).

Como referencia, se muestran imágenes representativas del tratamiento de las muestras de gDNA usando el protocolo mencionado (**Figura 11**). Se utilizó el gDNA de las bacterias intracelulares recuperadas al tiempo 0 y 6 horas en cada replica biológica (**Figura 11A**, segundo carril). Estas muestras se digirieron con la endonucleasa *Acil*, obteniéndose fragmentos de diversos tamaños hasta los 700 pb (**Figura 11A**, tercer carril). Posteriormente, se ligaron los oligonucleótidos adaptadores “Adapter CG” y “Illumina_Index_CAGATC” a los productos de digestión. Esto permitió agregar secuencias conocidas a la región adyacente al *cassette* de Kan^R para amplificar posteriormente esa región. Al ligar los adaptadores se observó un aumento de tamaño de 50 pb en los fragmentos de gDNA digerido (**Figura 11A**, cuarto carril). Posteriormente, se realizó una purificación de los productos de ligación con el fin de eliminar los adaptadores que no se ligaron al gDNA digerido.

Luego, se realizó el proceso de amplificación como se describe en la sección 2.11 de Materiales y Métodos. Usando el partidor “PCR Primer 2.0” y los partidores de la serie “SGD 5' end code_X” se amplificaron las secuencias adyacentes al extremo 5' de *cassette* de Kan^R, denominadas “H1”. Usando el partidor “PCR Primer 2.0” y los partidores de la serie “SGD Index_7nt_X” se amplificaron las secuencias adyacentes al extremo 3' del *cassette* de Kan^R, denominadas “H2” (**Figura 4A**). En la **Figura 11B** se muestran los productos de amplificación de la

primera PCR obtenidos de una reacción representativa, junto con sus respectivos controles. En el tercer carril se agregó la mezcla de reacción sin DNA polimerasa *Taq* como control negativo. Esta primera PCR se realizó sólo durante 10 ciclos de amplificación para no alterar la proporción de las moléculas amplificables en la muestra. El producto de la primera PCR se purificó para eliminar el exceso de partidores remanente y se usó 1 µl de este producto purificado para realizar una segunda amplificación en la que se agregó a cada fragmento amplificado la secuencia P5 necesaria para su secuenciación mediante el sistema *MiSeq* de Illumina. Esta segunda PCR se realizó sólo durante 13 ciclos de amplificación para no alterar la proporción de moléculas amplificables en la muestra. En la **Figura 11C** se muestran los productos de amplificación de la segunda PCR obtenidos de una reacción representativa. Se observa amplificación sólo cuando se agregó el producto de la primera PCR como templado.

Mediante el protocolo descrito se obtuvieron genotecas para secuenciación de DNA mediante el sistema *MiSeq* de Illumina. El análisis posterior de los datos de secuenciación permitió determinar la abundancia relativa de cada mutante en las muestras analizadas.

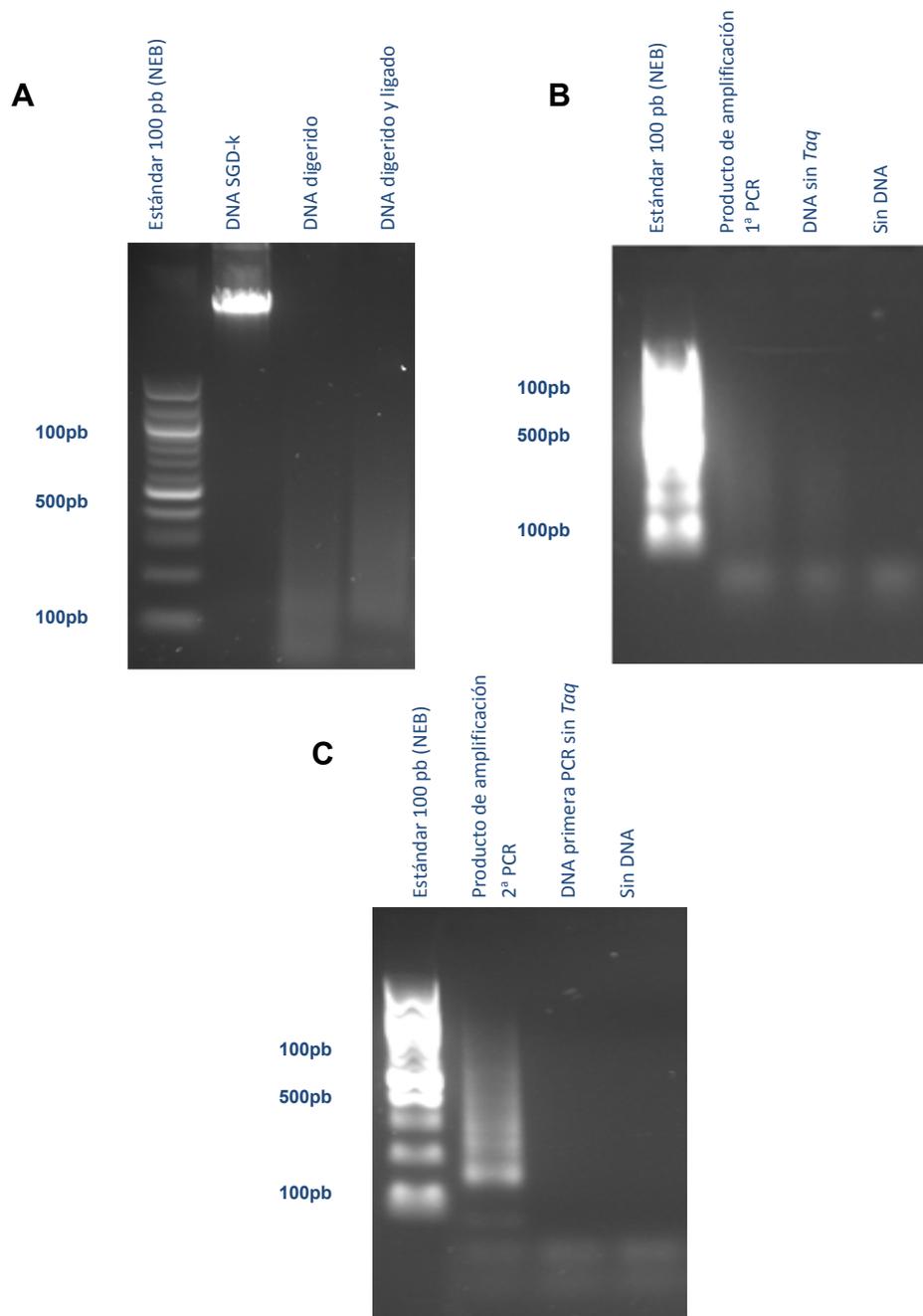


Figura 11.- Geles representativos de las distintas etapas del protocolo de generación de genotecas de secuenciación. Las fotos corresponden a electroforesis en geles de agarosa al 2% en solución amortiguadora TAE de productos representativos del tratamiento de muestras de gDNA obtenidas de una condición experimental. En la figura **A** se muestra el producto de la digestión y la posterior ligación del mismo producto. En la figura **B** se muestran los resultados de la primera PCR y en la figura **C** los de la segunda PCR usando como templado los productos de la primera reacción. Los geles fueron teñidos con GelRed y visualizados sobre un transiluminador UV.

3.7 Secuenciación de las genotecas y análisis de los datos obtenidos

Mediante la secuenciación de las genotecas generadas se obtuvo un conjunto de secuencias que representaban regiones del genoma de *S. Typhimurium*. Cada una de estas secuencias se mapeó contra una base de datos que contenía los genes de *S. Typhimurium* 14028s. De esta forma, se obtuvo como resultado el número de lecturas que pudieron ser asignadas a algún gen de esta bacteria en cada una de las condiciones ensayadas. Los datos obtenidos permitieron calcular las abundancias relativas al total de lecturas obtenidas en cada condición.

A partir de la secuenciación se obtuvieron 11.076.160 lecturas (*reads*) totales. De éstas, sólo 2.344.224 (21,16%) pudieron ser mapeadas contra algún gen de *S. Typhimurium* 14028s. Para analizar la reproducibilidad de las réplicas biológicas, se determinó el índice de correlación lineal (R^2) entre los datos obtenidos a partir de pares de réplicas biológicas correspondientes a los tiempos 0 y 6 en el extremo H1 y H2 de cada mutante (**Figura 12**).

Debido a que no se observó una correlación evidente al comparar los datos obtenidos a partir de los extremos H1 y H2 de una misma condición y réplica biológica, se analizaron de manera independiente las lecturas obtenidas en cada extremo. De esta forma, de las ~3690 mutantes presentes en la genoteca se obtuvieron datos para 2296 en el extremo H1 y H2. A partir de estos datos, se consideró bajo selección negativa a aquellas mutantes cuyo promedio de abundancias relativas disminuía al menos a la mitad al comparar el T6 con el T0 ($\text{Log}_{10} 0,5 = -0,3010$). Así, en el extremo H1 se encontraron 350 mutantes bajo selección negativa (15,24%) mientras que en el extremo H2 las mutantes bajo selección negativa fueron 277 (12,06%).

Se usó el test *t* de Student para comparar las diferencias entre el promedio de las lecturas normalizadas del T6 y el promedio de las lecturas normalizadas del T0 para cada mutante. Se consideró que un valor de $T6/T0 \leq 0,5$ era estadísticamente significativo cuando estaba asociado a un valor de $P < 0,05$.

De acuerdo a este análisis, de las 350 mutantes bajo selección negativa identificadas por su extremo H1 sólo 50 presentaron valores significativos. Por otra parte, de las 277 mutantes bajo selección identificadas por su extremo H2 sólo 31 presentaron valores significativos (**Figura 13**).

En resumen, considerando los extremos H1 y H2 fue posible identificar un total de 81 mutantes independientes bajo selección negativa. Entre éstas se encontraron mutantes en genes relacionados con la virulencia de *Salmonella*, como los asociados a SPI-1 ($\Delta orgB$) y SPI-2 ($\Delta ssrA$, $\Delta ssaR$ y $\Delta pipB2$).

Los genes correspondientes a las mutantes identificadas fueron clasificados y agrupados según las categorías funcionales de grupos ortólogos (*Clusters of Orthologous Groups* (COGs) (Tatusov *et al.*, 2000). Este análisis permitió identificar 24 mutantes (29,6% de las mutantes bajo selección) que participan en metabolismo, incluyendo aquellas asociadas al metabolismo de carbohidratos (11 mutantes, 13,5% de las mutantes bajo selección) y de aminoácidos (5 mutantes, 6,17% de las mutantes bajo selección). En el análisis también se identificaron mutantes relacionadas con la síntesis de la membrana o pared celular (4 mutantes, 4,9% de las mutantes bajo selección) y un grupo de 25 mutantes (30,86% de las mutantes bajo selección) en genes que codifican proteínas hipotéticas, desconocidas o pobremente caracterizadas (**Figura 14**). La lista completa de mutantes bajo selección negativa identificadas en este trabajo se muestra en el **Anexo 1**.

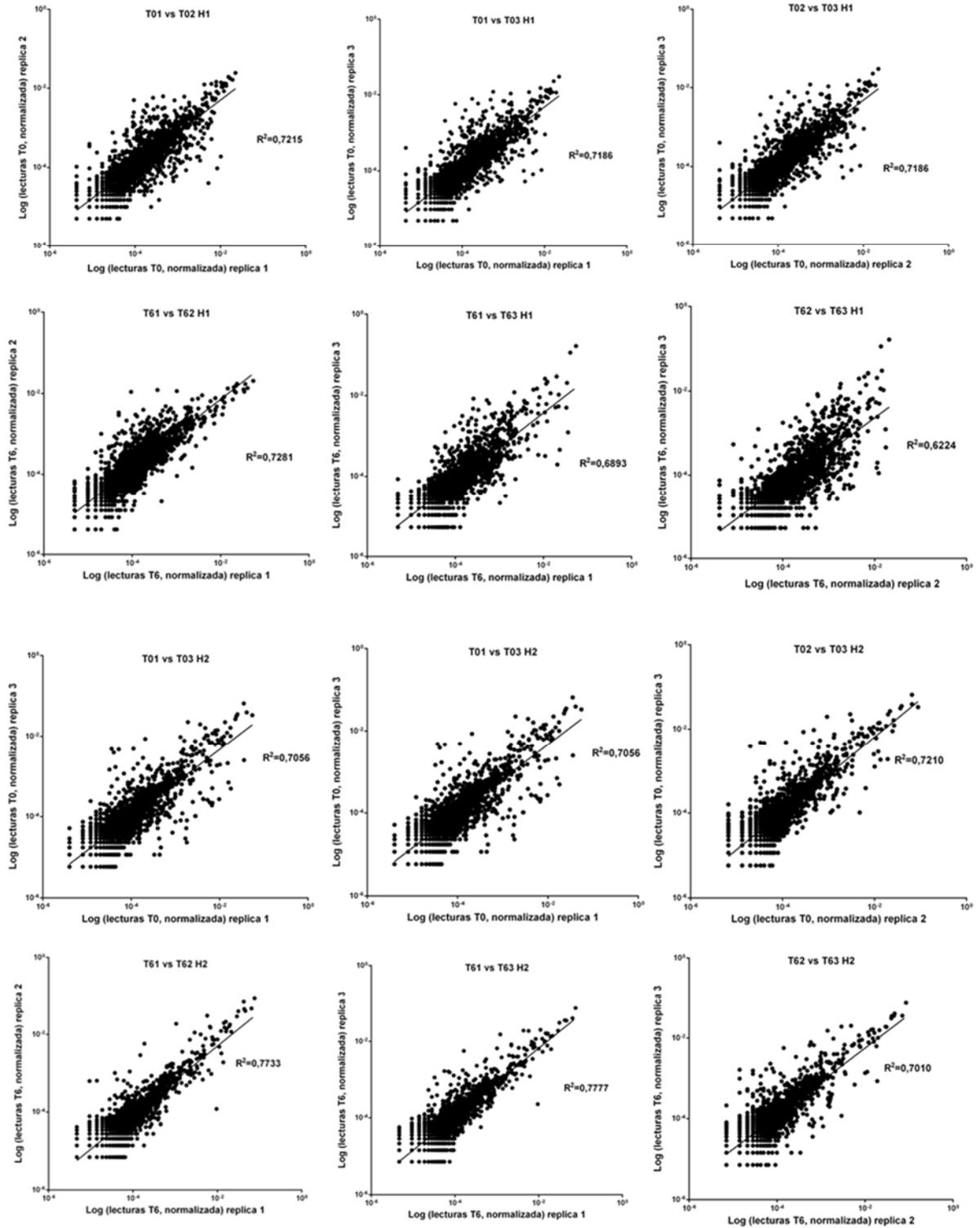


Figura 12. Gráficos de correlación entre réplicas biológicas. Los gráficos muestran el Log₁₀ del número de lecturas obtenidas para cada mutante, normalizadas por el número total de lecturas obtenidas en esa condición y replica biológica. Los gráficos muestran el coeficiente de correlación lineal (R²).

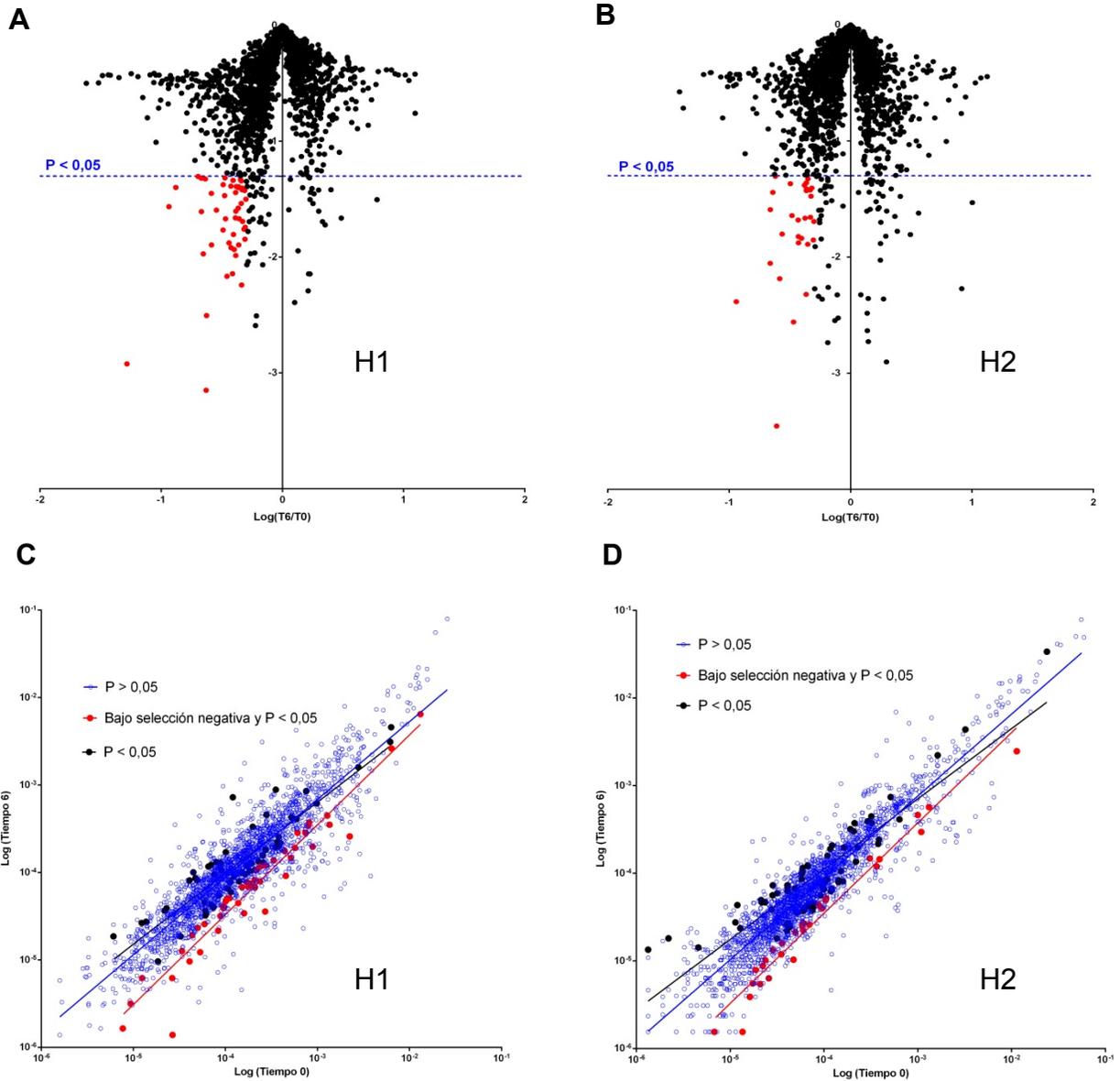


Figura 13.- Análisis de los datos de secuenciación. En la figura A y B, cada punto representan una mutante. En las abscisas se graficó el Log_{10} ($T6/T0$) y en la ordenada se graficó el Log_{10} (P). La línea azul punteada marca en el eje de las ordenadas el valor $P < 0,05$ que se definió como límite de significancia estadística. Las mutantes bajo selección negativa que poseen un $P < 0,05$ se muestran en rojo. En las figuras C y D, cada punto representa una mutante identificada en la abscisa por el Log_{10} del promedio de las lecturas del T0 normalizadas y en la ordenada el Log_{10} del promedio de las lecturas del T6 normalizadas. En azul se muestran las mutantes con un $P > 0,05$. En negro se muestran las mutantes con un $P < 0,05$ pero que no se encuentran bajo selección. En rojo se muestran las mutantes con un $P < 0,05$ y que se encuentran bajo selección negativa.

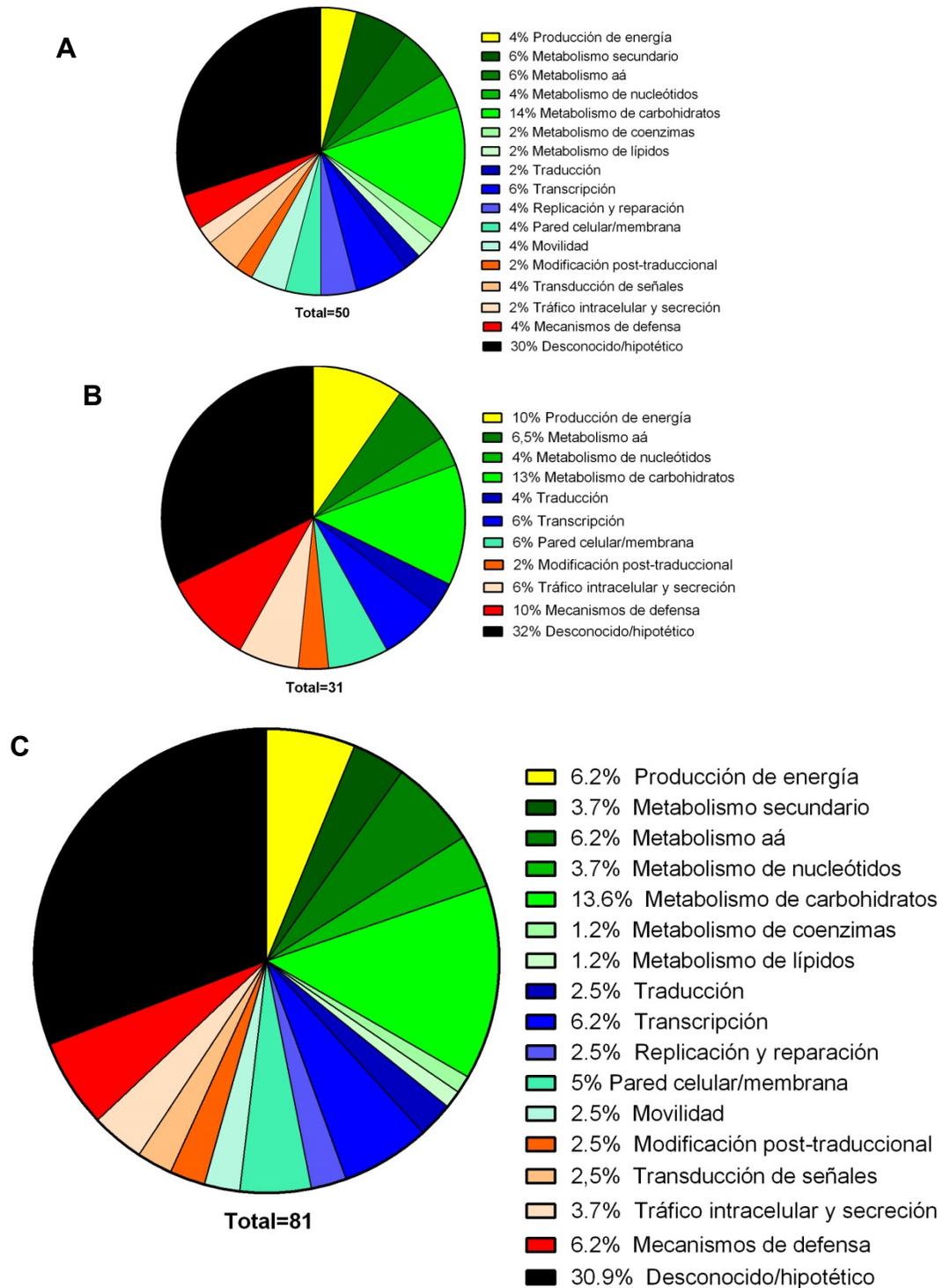


Figura 14. Análisis de categorías funcionales de grupos ortólogos (COGs). Los genes correspondientes a las mutantes bajo selección negativa se agruparon según sus categorías funcionales. En la figura se muestran las categorías identificadas a partir del análisis de los datos correspondientes a la región H1 (**A**), H2 (**B**) o ambas (**C**).

4.- DISCUSIÓN

4.1 *S. Typhimurium* es capaz de sobrevivir intracelularmente en *D. discoideum*

En este trabajo determinamos que *S. Typhimurium* es capaz de sobrevivir intracelularmente en la ameba social *Dictyostelium discoideum* incluso luego de 24 horas de infección. Estas observaciones se contraponen a lo descrito por Skriwan (Skriwan *et al.*, 2002) y Jia (Jia *et al.*, 2009), quienes sólo describieron fenómenos similares en cepas mutantes de *D. discoideum* que presentan deficiencias en los procesos de polimerización de actina y fagocitosis, respectivamente. Este fenómeno de supervivencia intracelular no se observa cuando *D. discoideum* se infecta con bacterias como *Echerichia coli* B/r, que son utilizadas en el laboratorio como alimento de la ameba y que son degradadas rápidamente una vez que son fagocitadas. Sin embargo, cuando *D. discoideum* es infectado con *Salmonella* la ameba es incapaz de utilizarla como alimento. Esto se observa si evaluamos el aumento en el número de amebas luego de 24 horas de infección. Nuestros antecedentes son consistentes con lo que plantea Sillo (Sillo *et al.*, 2011), quien señala que *Salmonella* es patógena para *D. discoideum* e impide su desarrollo social.

Una posible explicación de las diferencias observadas en la interacción entre *D. discoideum* y *S. Typhimurium* se debe al uso de distintas metodologías para llevar a cabo los ensayos de infección y por consiguiente la obtención de diferentes resultados y conclusiones. Según lo que hemos demostrado, al usar Gen en el medio durante el ensayo el antibiótico logra penetrar en la ameba y eliminar completamente las bacterias intracelulares al cabo de 3 horas de infección. Estos datos resuelven una polémica de si este antibiótico podría ser utilizado de la misma forma como se usa en los ensayos de supervivencia intracelular en macrófagos y permite explicar por qué algunos autores no encontraron que *Salmonella* era capaz de sobrevivir al interior de *D. discoideum*. Considerando estas observaciones, al realizar nuestras infecciones experimentales tuvimos que estandarizar las condiciones de ensayo. Finalmente,

nuestro protocolo es similar a los ensayos de protección a Gen, pero a diferencia de éstos, el antibiótico sólo se utiliza durante los lavados y por un periodo corto. Además, utilizamos la Gen a una concentración de 10 µg/mL, que corresponde al valor de la MIC del antibiótico para *S. Typhimurium*.

4.2 Validación de nuestros ensayos de infección de *D. discoideum* usando mutantes de *S. Typhimurium* en genes asociados a patogenicidad en otros modelos

Los ensayos de infección que se realizaron en esta tesis corresponden a ensayos de infección simple y de competencia. Estos últimos demostraron ser más sensibles para evaluar la supervivencia intracelular de diferentes cepas de *Salmonella*. Esto se debe a que el IC permite una comparación directa entre las diferentes cepas utilizadas en los ensayos y elimina la variabilidad intrínseca de los ensayos de infección simple haciendo todos los cálculos relativos a la cepa silvestre presente en el mismo ambiente selectivo que las mutantes a estudiar.

En nuestros ensayos evaluamos mutantes en genes asociados con los principales mecanismos de patogenicidad de *Salmonella*, que se encuentran codificados en SPI-1 y SPI-2 ($\Delta invA$ y $\Delta ssaD$, respectivamente). Además, evaluamos una mutante $\Delta phoPQ$ que no posee el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ que participa en la regulación de la expresión de genes relacionados con la virulencia de *Salmonella*. También evaluamos la supervivencia de una mutante $\Delta aroA$, que presenta problemas metabólicos asociados con las vías de síntesis de compuestos aromáticos. Estos problemas en la síntesis de la pared y la membrana externa generan un importante grado de atenuación de las mutantes en aves, humanos y cerdos (Sebkova *et al.*, 2008) junto a la mutante $\Delta phoN$, que en otros modelos se comporta de forma similar a la cepa silvestre (Sivula *et al.*, 2008; Weening *et al.*, 2005).

A partir de los resultados obtenidos en nuestros ensayos de competencia es posible destacar varios aspectos. Las mutantes de *S. Typhimurium* en genes estructurales de las islas de SPI-1 y SPI-2 son fagocitadas por *D. discoideum* de

manera más eficiente que la cepa silvestre. Esto sugiere que SPI-1 y SPI-2 juegan un papel importante en la evasión de la fagocitosis durante la infección de amebas. Comúnmente se asocia a la SPI-1 con el ingreso de *Salmonella* a células no fagocíticas como las células del epitelio intestinal (Klein *et al.*, 2000). Se reportó que la SPI-1 podría tener un rol al modular el ingreso de la bacteria a células dendríticas (Bueno *et al.*, 2010), impidiendo el ingreso masivo de la bacteria a estas células. Este trabajo sostiene la idea que algún efector de la SPI-1 puede inhibir la fagocitosis mediada por las células dendríticas. Esto podría explicar en parte el fenómeno observado en nuestros ensayos. Por otra parte, la mutante Δ *aroA* presenta problemas de supervivencia intracelular al interior de *D. discoideum* luego de 6 horas de infección, al igual que las mutantes en genes de virulencia de *Salmonella* (Δ *invA* y Δ *ssaD*) que también presentan problemas de supervivencia intracelular en *D. discoideum*. Finalmente, las mutantes Δ *phoPQ* y Δ *phoN* se comportaron de manera similar a la cepa silvestre, al contrario de las otras mutantes evaluadas. Este mismo comportamiento ha sido descrito para la mutante Δ *phoN* en otros modelos de infección, como aves (Sivula *et al.*, 2008) y ratones (Weening *et al.*, 2005). Sin embargo, se ha descrito que las mutantes en los genes *phoP* y *phoQ* presentan problemas de supervivencia en diferentes modelos de infección, incluyendo ratones y macrófagos en cultivo (Miller *et al.*, 1989).

4.3 Identificación a escala genómica de genes involucrados en la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*

En este trabajo se generó un protocolo que permite determinar la abundancia relativa de las mutantes presentes en la colección SGD-K de *S. Typhimurium* 14028s. Mediante la amplificación por PCR y posterior secuenciación utilizando el sistema *MiSeq* de Illumina se identificaron mutantes bajo selección negativa luego de 6 horas al interior de *D. discoideum*.

Si bien mediante este protocolo es posible identificar mutantes bajo selección negativa, el rango dinámico de nuestro ensayo fue bastante acotado. Esto nos obligó a usar como criterio de selección que una mutante disminuyera su

abundancia relativa a T6 al menos a la mitad del valor obtenido al T0 ($T6/T0 \leq 0,5$) para ser considerada bajo selección negativa. Una estrategia que podría aumentar el grado de selección en nuestro sistema experimental sería realizar infecciones sucesivas de *D. discoideum* con la genoteca de mutantes SGD-K, de forma de recuperar las mutantes sobrevivientes a las 6 horas de infección y ocupar éstas para infectar nuevamente la ameba. Mediante esta estrategia se podría someter la genoteca a un proceso de selección más estricto. Por otra parte, el estrecho rango dinámico de nuestro ensayo también estaría relacionado con la escasa profundidad de secuencia obtenida para las muestras analizadas. De hecho, sólo se pudieron mapear alrededor de 200.000 lecturas por condición experimental en algunos de los genes de *S. Typhimurium*. A fin de obtener un mayor número de secuencias mapeadas es recomendable secuenciar nuestras muestras utilizando un método con mayor rendimiento, como el sistema *HiSeq* de Illumina.

Las mutantes bajo selección negativa que fueron identificados mediante nuestro análisis a nivel genómico muestran una correlación con las mutantes probadas en los ensayos de infección (competencia o individuales). De hecho, se identificaron 3 mutantes bajo selección negativa que se relacionan con la mutante Δ *ssaD* (proteína estructural del T3SS codificado en SPI-2). Estas mutantes corresponden a Δ *ssrA*, Δ *ssaR* y Δ *pipB2*, que codifican un miembro del sistema de dos componentes SsrA/SsrB que regula la expresión de genes de la SPI-2, una proteína estructural del T3SS codificado en SPI-2 y un efector secretado por este T3SS, respectivamente. Por otra parte, en nuestro análisis también identificamos la mutante Δ *orgB*, que corresponde a un gen esencial para el funcionamiento del T3SS codificado en SPI-1. Así, el fenotipo de esta mutante estaría relacionado al observado en la mutante Δ *invA* (proteína estructural del T3SS codificado en SPI-1) que presenta problemas de supervivencia en la ameba a las 6 horas de infección. Cabe destacar que nuestro análisis a nivel genómico indica que las mutantes Δ *phoN*, Δ *phoP* y Δ *phoQ* no se encuentran bajo selección negativa. Estos resultados concuerdan con lo observado en nuestros ensayos de competencia. Sin embargo, la mutante Δ *aroA* presentó deficiencias en supervivencia intracelular

en los ensayos de competencia pero no en el análisis genómico. Esta discrepancia sugiere que nuestros métodos de análisis de datos son susceptibles de mejora.

Además de las mutantes mencionadas, nuestro análisis a escala genómica permitió la identificación de mutantes bajo selección negativa en otros genes de interés como *rpoE*, que codifica un factor sigma alternativo (σE) que regula la expresión de genes en respuesta a estrés extracitoplasmático. Estas condiciones se manifiestan cuando existen errores en el plegamiento de proteínas de la envoltura bacteriana (Mecsas *et al.*, 1993). La expresión de σE también se induce en condiciones de shock hiperosmótico, exposición a metales tóxicos, cambios en la estructura del lipopolisacárido (Bianchi y Baneyx, 1999; Egler *et al.*, 2005; Tam y Missiakas, 2005), así como también en condiciones de carencia de nutrientes al comienzo de la fase estacionaria (Costanzo y Ades, 2006). La mutante $\Delta creB$ también presentó selección negativa en nuestro ensayo. Este gen codifica la proteína CreB, un regulador transcripcional global que permite a la bacteria responder a condiciones de crecimiento en medio mínimo (Avison *et al.*, 2001). Estas observaciones nos permiten tener una idea general del ambiente en el que se encuentra *S. Typhimurium* al interior de *D. discoideum*.

Además de los genes mencionados, se encontraron mutantes en 4 genes relacionados con el catabolismo de compuestos aromáticos (*hpaB*, *hpaH*, *hpaE* y *hpaX*). Estos genes participan en el catabolismo del 4-hidroxifenil acetato (4-HPA) (Prieto *et al.*, 1996). Esta ruta catabólica está codificada en los operones *hpaBC* y *hpaGEDFHI* en el genoma de *S. Typhimurium*. La presencia de mutantes de estos genes bajo selección negativa en *D. discoideum* sugiere que *Salmonella* necesita degradar ciertos compuestos aromáticos que pueden estar presentes al interior de la ameba, tal vez para usarlos como fuente de carbono. Se ha reportado que mutantes en los genes de esta ruta catabólica se encuentran bajo selección negativa durante la infección de *S. Typhimurium* en el tracto gastrointestinal de cerdos (Huang *et al.*, 2007).

Otro gen identificado en nuestro análisis a escala genómica fue *mliC*, que codifica un inhibidor de lisozima. Según datos obtenidos mediante análisis del perfil

transcripcional de *D. discoideum*, se observó un aumento de la expresión de la lisozima putativa AlyL sólo al crecer la ameba en presencia de bacterias Gram negativo (Nasser *et al.*, 2013). La producción de esta lisozima en la ameba podría explicar por qué la mutante $\Delta mliC$ se encuentra bajo selección negativa en nuestro análisis.

Es particularmente interesante el hecho que no se encontrara una relación entre las secuencias obtenidas a partir del extremo 5' y 3' del *cassette* de Kan^R (regiones H1 y H2) al analizar los datos de secuenciación. Teóricamente, cada mutante debiese arrojar información similar al analizar los cambios en la abundancia relativa cuando se compara el T6 con el T0. A pesar de esto, fue posible identificar genes relacionados con una misma función al analizar los datos de secuenciación obtenidos a partir de ambos extremos, como los genes del catabolismo del 4-HPA mencionados anteriormente. Esto puede deberse a que en ambos extremos (H1 y H2) el largo de la región comprendida entre el *cassete* de Kan^R y el sitio de corte de la enzima *Acil* usado para ligar los adaptadores es demasiado variable. Este tamaño variable puede afectar la eficiencia del proceso de amplificación, lo que sumado a la escasa profundidad conseguida en la secuenciación de nuestras muestras impediría comparar o establecer relaciones entre las secuencias detectadas a ambos extremos del *cassete* de Kan^R.

Si bien el protocolo de amplificación utilizado para la generación de la genoteca de secuenciación y el posterior análisis de los datos nos permite identificar mutantes de *S. Typhimurium* bajo selección negativa al interior de la ameba *D. discoideum*, es necesario robustecer la etapa de selección con los mecanismos propuestos y confirmar los fenotipos observados en el análisis a escala genómica mediante ensayos de competencia y complementación.

5.- CONCLUSIONES

- *S. Typhimurium* es capaz de infectar y sobrevivir intracelularmente en *D. discoideum*.
- Las mutantes $\Delta invA$ y $\Delta ssaD$ de *S. Typhimurium* son internalizadas de manera más eficiente que la cepa silvestre, sugiriendo un rol de SPI-1 y SPI-2 en la evasión de la fagocitosis por *D. discoideum*.
- Mutantes de *S. Typhimurium* en genes relacionados con virulencia ($\Delta invA$ y $\Delta ssaD$), así como en la ruta biosíntesis de compuestos aromáticos ($\Delta aroA$) presentan problemas de supervivencia intracelular en *D. discoideum*, indicando que estos genes son requeridos para este proceso.
- Se desarrolló un protocolo que permite identificar y evaluar la abundancia relativa de cada mutante presente en la genoteca SGD-K de *S. Typhimurium* mediante secuenciación masiva usando el sistema *MiSeq* de Illumina.
- Mediante un análisis a escala genómica se identificaron 81 genes cuyas mutantes presentan selección negativa en *D. discoideum*. Estos genes serían necesarios para la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*.

6.- BIBLIOGRAFIA

- Avison, M. B., Horton, R. E., Walsh, T. R., y Bennett, P. M. (2001). *Escherichia coli* CreBC Is a Global Regulator of Gene Expression That Responds to Growth in Minimal Media. *J. Biol. Chem.* 276, 26955–26961.
- Bianchi, A A, y Baneyx, F. (1999). Hyperosmotic shock induces the sigma32 and sigmaE stress regulons of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 34, 1029–38.
- Blanc-Potard, A. B., Solomon, F., Kayser, J., y Groisman, E. A. (1999). The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* 181, 998–1004.
- Bozzaro, S., y Eichinger, L. (2011). The professional phagocyte *Dictyostelium discoideum* as a model host for bacterial pathogens. *Curr. Drug Targets* 12, 942–954.
- Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., y Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* Nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2465–2467.
- Bueno, S. M., Wozniak, A., Leiva, E. D., Riquelme, S., Carreño, L. J., Hardt, W. D., Riedel, C., y Kalergis, A. M. (2010). *Salmonella* pathogenicity island 1 differentially modulates bacterial entry to dendritic and non-phagocytic cells. *Immunology* 130, 273–287.
- Canals, R., McClelland, M., Santiviago, C. A y Andrews-Polymenis, H. (2011). Genomics of *Salmonella* Species in Genomics of Foodborne Pathogens Wei Zhang, W. y Wiedmann, M. Springer New York, pp 171-235.
- Costanzo, A., y Ades, S. E. (2006). Growth phase-dependent regulation of the extracytoplasmic stress factor, sigmaE, by guanosine 3',5'- bispyrophosphate (ppGpp). *J. Bacteriol.* 188, 4627–4634.
- Cosson, P., y Soldati, T. (2008). Eat, kill or die: when amoeba meets bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 271–276.
- Datsenko, K., y Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6640–6645.
- Egler, M., Grosse, C., Grass, G., y Nies, D. H. (2005). Role of the extracytoplasmic function protein family sigma factor RpoE in metal resistance of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187, 2297–307.
- Eichinger, L., Pachebat, J. A., Glöckner, G., Rajandream, M.-A., Sucgang, R.,

Berriman, M., Song, J., Olsen, R., Szafranski, K., Xu, Q., Tungga, I. B., Kummerfeld, S., Madera, M., Konfortov, B.A., Rivero, F., Bankier, A.T., Lehmann, R., Hamlin, N., Davies, R., Gaudet, P., Fey, P., Pilcher, K., Chen, G., Saunders, D., Sodergren, E., Davis, P., Kerhornou, A., Nie, X., Hall, N., Anjard, C., Hemphill, L., Bason, N., Farbrother, P., Desany, B., Just, E., Morio, T., Rost, R., Churcher, C., Cooper, J., Haydock, S., van Driessche, N., Cronin, A., Goodhead, I., Muzny, D., Mourier, T., Pain, A., Lu, M., Harper, D., Lindsay, R., Hauser, H., James, K., Quiles, M., Madan Babu, M., Saito, T., Buchrieser, C., Wardroper, A., Felder, M., Thangavelu, M., Johnson, D., Knights, A., Louseged, H., Mungall, K., Oliver, K., Price, C., Quail, M.A., Urushihara, H., Hernandez, J., Rabbinowitsch, E., Steffen, D., Sanders, M., Ma, J., Kohara, Y., Sharp, S., Simmonds, M., Spiegler, S., Tivey, A., Sugano, S., White, B., Walker, D., Woodward, J., Winckler, T., Tanaka, Y., Shaulsky, G., Schleicher, M., Weinstock, G., Rosenthal, A., Cox, E.C., Chisholm, R.L., Gibbs, R., Loomis, W. F., Platzer, M., Kay, R. R., Williams, J., Dear, P. H., Noegel, A. A., Barrell, B., y Kuspa, A. (2005). The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 435, 43–57.

Escoll, P., Rolando, M., Gomez-Valero, L., y Buchrieser, C. (2013). From amoeba to macrophages: exploring the molecular mechanisms of *Legionella pneumophila* infection in both hosts. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 376, 1–34.

Feng, Y., Hsiao, Y. H., Chen, H. L., Chu, C., Tang, P., y Chiu, C. H. (2009). Apoptosis-like cell death induced by *Salmonella* in *Acanthamoeba rhysodes*. *Genomics* 94, 132–137.

Galán, J. E., y Curtiss, R. (1989). Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella* Typhimurium to penetrate tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 6383–6387.

Gaudet, P., Williams, J. G., Fey, P., y Chisholm, R. L. (2008). An anatomy ontology to represent biological knowledge in *Dictyostelium discoideum*. *BMC Genomics* 9, 130.

Gerlach, R. G., Jäckel, D., Geymeier, N., y Hensel, M. (2007). *Salmonella* pathogenicity island 4-mediated adhesion is coregulated with invasion genes in *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.* 75, 4697–4709.

Grimont, P., y Weill, F.-X. (2008). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. *WHO Collab. Cent. Ref. Res. Salmonella*, 1–167.

Gulig, P. A., Danbara, H., Guiney, D. G., Lax, A. J., Norel, F., y Rhen, M. (1993). Molecular analysis of spv virulence genes of the *Salmonella* virulence

- plasmids. *Mol. Microbiol.* 7, 825–830.
- Haraga, A., Ohlson, M. B., y Miller, S. I. (2008). *Salmonella* interplay with host cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 53–66.
- Hensel, M., Shea, J. E., Gleeson, C., Jones, M. D., Dalton, E., y Holden, D. W. (1995). Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* 269, 400–403.
- Huang, Y., Leming, C. L., Suyemoto, M., y Altier, C. (2007). Genome-wide screen of *Salmonella* genes expressed during infection in pigs, using in vivo expression technology. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7522–7530.
- Ibarra, J. A., y Steele-Mortimer, O. (2009). *Salmonella* - the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cell. Microbiol.* 11, 1579–1586.
- Jarvik, T., Smillie, C., Groisman, E. A., y Ochman, H. (2010). Short-Term Signatures of Evolutionary Change in the *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium 14028 Genome. *J. Bacteriol.* 192, 560–567.
- Jia, K., Thomas, C., Akbar, M., Sun, Q., Adams-Huet, B., Gilpin, C., y Levine, B. (2009). Autophagy genes protect against *Salmonella* Typhimurium infection and mediate insulin signaling-regulated pathogen resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 14564–14569.
- Kessin, R. H. (2001). *Dictyostelium*: Evolution, Cell Biology, and the Development of Multicellularity (Available at: <https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=rm7wHyUYSiAC&pgis=1>).
- Klein, J. R., Fahlen, T. F., y Jones, B. D. (2000). Transcriptional Organization and Function of Invasion Genes within *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Pathogenicity Island 1, Including the *prgH*, *prgI*, *prgJ*, *prgK*, *orgA*, *orgB*, and *orgC* Genes. *Infect. Immunity* 68, 3368–3376.
- Lawley, T. D., Chan, K., Thompson, L. J., Kim, C. C., Govoni, G. R., y Monack, D. M. (2006). Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS Pathog.* 2, e11.
- MacLennan, C. A., Gondwe, E. N., Msefula, C. L., Kingsley, R. A., Thomson, N. R., White, S. A., Goodall, M., Pickard, D. J., Graham, S. M., Dougan, G., Hart, C, A., Molyneux, M, E., y Drayson, M, T. (2008). The neglected role of antibody in protection against bacteremia caused by nontyphoidal strains of *Salmonella* in African children. *J. Clin. Invest.* 118, 1553–1562.

- Mecenas, J., Rouviere, P. E., Erickson, J. W., Donohue, T. J., and Gross, C. a (1993). The activity of sigma E, an *Escherichia coli* heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Dev.* 7, 2618–2628.
- Miller, S. I., Kukral, A. M., y Mekalanos, J. J. (1989). A two-component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 5054–8.
- Morpeth, S. C., Ramadhani, H. O., y Crump, J. A. (2009). Invasive non-Typhi *Salmonella* disease in Africa. *Clin. Infect. Dis.* 49, 606–611.
- Nasser, W., Santhanam, B., Miranda, E. R., Parikh, A., Juneja, K., Rot, G., Dinh, C., Chen, R., Zupan, B., Shaulsky, G., y Kuspa, A. (2013). Bacterial discrimination by dictyostelid amoebae reveals the complexity of ancient interspecies interactions. *Curr. Biol.* 23, 862–872.
- Porwollik, S., Santiviago, C. A., Cheng, P., Long, F., Desai, P., Fredlund, J., Srikumar, S., Silva, C. A., Chu, W., Chen, X., Canals, R., Reynolds, M. M., Bogomolnaya, L., Shields, C., Cui, P., Guo, J., Zheng, Y., Endicott-Yazdani, T., Yang, H., Maple, A., Ragoza, Y., Blondel, C. J., Valenzuela, C., Andrews-Polymenis, H., y McClelland, M. (2014). Defined single-gene and multi-gene deletion mutant collections in *Salmonella enterica* sv Typhimurium. *PLoS One* 9, e99820.
- Prieto, M., Díaz, E., y García, J. L. (1996). Molecular characterization of the 4-hydroxyphenylacetate catabolic pathway of *Escherichia coli* W: engineering a mobile aromatic degradative cluster. *J. Bacteriol.* 178, 111–20.
- Rehfuss, M. Y. M., Parker, C. T., y Brandl, M. T. (2011). *Salmonella* transcriptional signature in *Tetrahymena* phagosomes y role of acid tolerance in passage through the protist. *ISME J.* 5, 262–73.
- Salcedo, S. P., Noursadeghi, M., Cohen, J., y Holden, D. W. (2001). Intracellular replication of *Salmonella* Typhimurium strains in specific subsets of splenic macrophages *in vivo*. *Cell. Microbiol.* 3, 587–597.
- Santiviago, C. A., Reynolds, M. M., Porwollik, S., Choi, S. H., Long, F., Andrews-Polymenis, H. L., y McClelland, M. (2009). Analysis of pools of targeted *Salmonella* deletion mutants identifies novel genes affecting fitness during competitive infection in mice. *PLoS Pathog.* 5(7):e1000477.
- Sebkova, A., Karasova, D., Crhanova, M., Budinska, E., y Rychlik, I. (2008). *aro* mutations in *Salmonella enterica* cause defects in cell wall and outer

- membrane integrity. *J. Bacteriol.* 190, 3155–3160.
- Sillo, A., Matthias, J., Konertz, R., Bozzaro, S., y Eichinger, L. (2011). *Salmonella* Typhimurium is pathogenic for *Dictyostelium* cells and subverts the starvation response. *Cell. Microbiol.* 13, 1793–1811.
- Sivula, C. P., Bogomolnaya, L. M., y Andrews-Polymenis, H. L. (2008). A comparison of cecal colonization of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in white leghorn chicks and *Salmonella*-resistant mice. *BMC Microbiol.* 8, 182.
- Skriwan, C., Fajardo, M., Hägele, S., Horn, M., Wagner, M., Michel, R., Krohne, G., Schleicher, M., Hacker, J., y Steinert, M. (2002). Various bacterial pathogens and symbionts infect the amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 615–624.
- Tam, C., y Missiakas, D. (2005). Changes in lipopolysaccharide structure induce the sigma(E)-dependent response of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 55, 1403–12.
- Tatusov, R. L., Galperin, M. Y., Natale, D. A., y Koonin, E. V (2000). The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res.* 28, 33–36.
- Tezcan-Merdol, D., Ljungström, M., Winięcka-Krusnell, J., Linder, E., Engstrand, L., y Rhen, M. (2004). Uptake and replication of *Salmonella enterica* in *Acanthamoeba rhysodes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3706–3714.
- Weening, E. H., Barker, J. D., Laarakker, M. C., Humphries, A. D., Tsolis, R. M., Andreas, J., Tsolis, M., y Ba, A. J. (2005). The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium *lpf*, *bcf*, *stb*, *stc*, *std*, and *sth* fimbrial operons are required for intestinal persistence in mice. *Infect Immun.* 73, 3358–3366.
- Wong, K. K., McClelland, M., Stillwell, L. C., Sisk, E. C., Thurston, S. J., y Saffer, J. D. (1998). Identification and sequence analysis of a 27-kilobase chromosomal fragment containing a *Salmonella* pathogenicity island located at 92 minutes on the chromosome map of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Infect. Immun.* 66, 3365–3371.
- Wood, M. W., Jones, M. A., Watson, P. R., Hedges, S., Wallis, T. S., y Galyov, E. E. (1998). Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. *Mol. Microbiol.* 29, 883–891.

7.- ANEXO

7.1 Mutantes de *Salmonella* Typhimurium bajo selección negativa en *Dictyostelium discoideum*

La tabla muestra los genes de *S. Typhimurium* cuyas mutantes se encuentran bajo selección negativa en *D. discoideum* ($T6/T0 \leq 0,5$ y $P < 0,05$). La anotación de cada gen se obtuvo a partir del genoma de la cepa de referencia *S. Typhimurium* 14028s. Las columnas "H1" y "H2" indican si la mutante fue identificada en el análisis de los datos obtenidos a partir de la secuenciación del extremo H1 o H2, respectivamente.

Identificador del gen	Símbolo del gen	Descripción	T6/T0	P	COGs	H1	H2
STM14_0053	yaaY	putative cytoplasmic protein	0,23	0,047	-	x	
STM14_0175	ampD	N-acetyl-anhydromuranmyl-L-alanine amidase	0,11	0,004	V		X
STM14_0226	mrcB	penicillin-binding protein 1b	0,37	0,015	M		X
STM14_0355	safD	putative fimbrial subunit	0,39	0,015	-		X
STM14_0368	yafK	putative periplasmic protein	0,44	0,021	S	x	
STM14_0466	araJ	protein AraJ	0,39	0,007	G	x	
STM14_0475	malZ	maltodextrin glucosidase	0,47	0,020	G	x	
STM14_0548	tesB	acyl-CoA thioesterase II	0,36	0,013	I	x	
STM14_0557	hha	hemolysin expression-modulating protein	0,21	0,048	-	x	
STM14_0565	ybaM	hypothetical protein	0,00	0,002	-		X
STM14_0663	pheP	phenylalanine transporter	0,49	0,014	E		X
STM14_0749	ybeA	SPOUT methyltransferase superfamily protein	0,34	0,003	S		X
STM14_1023	grxA	glutaredoxin 1	0,42	0,022	O		X
STM14_1044	ybjP	putative lipoprotein	0,45	0,047	-		X
STM14_1062	cspD	stress response protein	0,34	0,021	K	x	
STM14_1247	hpaB	4-hydroxyphenylacetate catabolism	0,12	0,027	Q	x	
STM14_1251	hpaE	4-hydroxyphenylacetate catabolism	0,48	0,039	C		X
STM14_1255	hpaH	4-hydroxyphenylacetate catabolism	0,41	0,010	Q	x	
STM14_1257	hpaX	4-hydroxyphenylacetate catabolism	0,50	0,020	G		X
STM14_1263	yccD	chaperone-modulator protein CbpM	0,26	0,007	-		X
STM14_1264	cbpA	curved DNA-binding protein CbpA	0,46	0,046	O	x	
STM14_1275	ymdF	putative cytoplasmic protein	0,26	0,036	R	x	
STM14_1314	ymdC	putative phospholipase	0,40	0,012	R	x	
STM14_1388	ycfR	putative outer membrane protein	0,24	0,050	-		X
STM14_1544	yeaO	putative cytoplasmic protein	0,43	0,026	S	x	
STM14_1657	ydiK	putative inner membrane protein	0,37	0,021	R		X

STM14_1687	<i>ssrA</i>	sensor kinase	0,41	0,025	V	x	
STM14_1715	<i>ssaR</i>	type III secretion system protein	0,05	0,001	U	x	
STM14_1734	<i>nemA</i>	N-ethylmaleimide reductase	0,38	0,012	C	x	
STM14_1745	<i>mliC</i>	lysozyme inhibitor	0,24	0,003	V	x	
STM14_1766	<i>malX</i>	None	0,23	0,036	F		X
STM14_1830	<i>ydeJ</i>	competence damage-inducible protein A	0,13	0,040	R	x	
STM14_1891	<i>adhP</i>	alcohol dehydrogenase	0,45	0,047	R	x	
STM14_1921	<i>yncC</i>	putative DNA-binding transcriptional regulator	0,39	0,046	K	x	
STM14_1924	<i>yncB</i>	putative NADP-dependent oxidoreductase	0,49	0,038	R	x	
STM14_1946	<i>tehB</i>	tellurite resistance protein TehB	0,43	0,041	Q	x	
STM14_2063	<i>yciH</i>	translation initiation factor Sui1	0,38	0,041	J	x	
STM14_2110	<i>oppA</i>	oligopeptide transport protein	0,49	0,014	-	x	
STM14_2182	<i>fadR</i>	fatty acid metabolism regulator	0,46	0,038	K		X
STM14_2341	<i>flhD</i>	transcriptional activator FlhD	0,50	0,032	N	x	
STM14_2420	<i>cspB</i>	putative cold-shock protein	0,00	0,032	K	x	
STM14_2572	<i>hisI</i>	bifunctional phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase	0,43	0,037	E		X
STM14_2588	<i>rfbC</i>	dTDP-4,deoxyrhamnose 3,5 epimerase	0,47	0,039	M	x	
STM14_2598	<i>cpsG</i>	phosphomannomutase	0,35	0,007	G	x	
STM14_2601	<i>wcaI</i>	glycosyl transferase	0,43	0,039	M		X
STM14_2618	<i>udk</i>	uridine kinase	0,32	0,017	F	x	
STM14_2744	<i>yeyG</i>	hypothetical protein	0,20	0,050	-	x	
STM14_2845	<i>menB</i>	naphthoate synthase	0,26	0,013	H	x	
STM14_2936	<i>sixA</i>	phosphohistidine phosphatase	0,25	0,000	T		X
STM14_2980	<i>yfeH</i>	putative Na ⁺ -dependent transporter	0,27	0,016	R		X
STM14_3033	<i>talA</i>	transaldolase A	0,43	0,005	G		X
STM14_3234	<i>rpoE</i>	RNA polymerase sigma factor RpoE	0,22	0,009	K		X
STM14_3350	<i>pipB2</i>	secreted effector protein	0,47	0,022	V		X
STM14_3443	<i>hycE</i>	hydrogenase 3 large subunit	0,22	0,011	C	x	
STM14_3468	<i>orgB</i>	needle complex export protein	0,22	0,026	T		X
STM14_3682	<i>yqfA</i>	putative hemolysin	0,32	0,043	R		X
STM14_3717	<i>tktA</i>	Transketolase	0,29	0,025	G	x	
STM14_3881	<i>uppP</i>	undecaprenyl pyrophosphate phosphatase	0,37	0,013	V		X
STM14_4071	<i>yhdH</i>	putative oxidoreductase	0,42	0,042	C		X
STM14_4196	<i>dam</i>	DNA adenine methylase	0,39	0,016	L	x	
STM14_4255	<i>glgA</i>	glycogen synthase	0,44	0,013	G		X
STM14_4360	<i>yhjR</i>	putative cytoplasmic protein	0,00	0,035	-	x	
STM14_4385	<i>lpfC</i>	long polar fimbrial outer membrane usher protein	0,41	0,022	N	x	
STM14_4475	<i>rfaK</i>	putative hexose transferase	0,41	0,036	M	x	
STM14_4503	<i>ligB</i>	NAD-dependent DNA ligase LigB	0,46	0,006	L	x	
STM14_4571	<i>uhpA</i>	DNA-binding transcriptional activator UhpA	0,33	0,034	T	x	
STM14_4674	<i>asnA</i>	asparagine synthetase AsnA	0,46	0,029	E	x	

STM14_4699	<i>ilvM</i>	acetolactate synthase 2 regulatory subunit	0,23	0,001	S	x	
STM14_4814	<i>yihI</i>	hypothetical protein	0,48	0,017	S	x	
STM14_4832	<i>yihQ</i>	alpha-glucosidase	0,33	0,023	G		X
STM14_4902	<i>yneA</i>	putative sugar transport protein	0,21	0,025	G	x	
STM14_4906	<i>tpiA</i>	triosephosphate isomerase	0,43	0,040	G	x	
STM14_4908	<i>yiiR</i>	putative inner membrane protein	0,32	0,042	S	x	
STM14_4944	<i>frwC</i>	putative fructose-like permease EIIC subunit 2	0,44	0,013	G	x	
STM14_4958	<i>argH</i>	argininosuccinate lyase	0,49	0,018	E	x	
STM14_5202	<i>aspA</i>	aspartate ammonia-lyase	0,34	0,048	E	x	
STM14_5216	<i>ecnB</i>	entericidin B membrane lipoprotein	0,00	0,001	-		X
STM14_5220	<i>frdD</i>	fumarate reductase subunit D	0,47	0,033	C		X
STM14_5248	<i>purA</i>	adenylosuccinate synthetase	0,42	0,041	F	x	
STM14_5351	<i>yjgF</i>	putative translation initiation inhibitor	0,43	0,044	J		X
STM14_5509	<i>creB</i>	DNA-binding response regulator CreB	0,47	0,038	T	x	