



**Contribución de los efectores SipA, SseF y SseG en la supervivencia intracelular de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en *Dictyostelium discoideum***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica Toxicológica y Diagnóstico Molecular y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:**

**JAIME IGNACIO ORTEGA BERRÍOS**

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

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

**Santiago - CHILE  
Junio 2021**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

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

**JAIME IGNACIO ORTEGA BERRÍOS**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización en Bioquímica Toxicológica y Diagnóstico Molecular y al Título de Bioquímico, en el examen público rendido el día

\_\_\_\_\_.

**Director de Tesis:**

**Dr. Carlos A. Santiviago**

\_\_\_\_\_

**Co-director de Tesis:**

**Dr. Sergio A. Álvarez**

\_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dr. Christian Wilson (Presidente)**

\_\_\_\_\_

**Dr. Davor Cotoras**

\_\_\_\_\_

**Dr. Carlos Blondel**

\_\_\_\_\_

*“It is only through interaction, through decision and choice, through confrontation, physical or mental, that the Force can grow within you”*

-Kreia-

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que me han acompañado y ayudado en todo este proceso, ayudándome en mi formación profesional y personal.

A mis padres, Alicia y Jaime, por permitirme crecer y formarme en un ambiente de total cariño, amor y respeto. Por darme la libertad de elegir mi propio camino, por apoyarme en absolutamente todos los momentos difíciles, y por preocuparse siempre por mi bienestar. Gracias por ser mis modelos a seguir. A mi hermana, a mis sobrinos y a mis tíos. Muchas gracias por el cariño y el apoyo. Sé que siempre podré contar con ustedes para cualquier cosa. Espero que jamás dejemos de compartir.

A mis amigos de la vida. A Polo, por ser de mis partners más cercanos de toda mi vida, gracias por esta genuina amistad que venimos desarrollando desde aquel 7°K del 2006 y en especial, por el amor a la música y a la buena comida (chatarra) que ambos compartimos. A Gallo, Farfán y a Javier. Simplemente no puedo pensar en uno de ustedes sin pensar en los 3. Muchas gracias por permitirme compartir una de mis pasiones gigantes, los videojuegos. Hay pocas cosas tan buenas como poder juntarme con ustedes y pasar toda la tarde conversando de ñoñerías. Gracias por apañarme en los momentos difíciles, espero que sepan que yo siempre estaré ahí. Álvaro, Richi, Gastón, Seba y Vitto, estaré siempre agradecido con ustedes por sacarme de la rutina y permitirme una desconexión total. Siempre recordaré esas tardes jugando PS3 con los ojos quemados, jajaja

A mi queridísimo piño. Pablo, Michi, Guille, Dani, Pol, Pau, Jero, Pipe, Clau, Rolo, Pili, Dine, Ibañez, Nacho. Si me pusiera a enumerar nuestras vivencias creo que estos agradecimientos serían tan largos como la tesis. Estoy infinitamente agradecido por el enorme, **enorme**, apañe de todos estos años. Por las risas, por las tallas pesadas, por compartir y ayudarnos en las dificultades de la vida, y por la cantidad gigante de alegrías que hemos tenido. Me da mucha felicidad el poder seguir compartiendo con ustedes, y sentir que el cariño que nos tenemos se sigue manteniendo. El poder vivir juntos la etapa universitaria ha sido de las mejores cosas que me ha pasado en la vida.

A mis directores de tesis, Cliff y Sergio. Por su dedicación y preocupación en cada etapa de este proceso. También quiero agradecerles toda la confianza y todas las enseñanzas, ya sea de microbiología y bioquímica, así como de música, jajaja. Son de los mejores profesores que he conocido.

A mi comisión evaluadora, al Dr. Christian Wilson, al Dr. Davor Cotoras y al Dr. Carlos Blondel. Gracias por sus consejos y comentarios.

Al Lab Micro. Feña, Andrea, Pali, Héctor, Morgan, Kamo, Bayron, Bea, Ítalo, Chinchi, Cami, Negro. Muchísimas gracias por hacer del laboratorio un excelente ambiente de trabajo. Son muy pocos los lugares en los que existe un compañerismo tan grande como el que hay en el lab. Agradezco enormemente todas las conversaciones, chancheos y salidas, y por sobretodo, el cariño y las infinitas risas. La cantidad de buenos recuerdos que me llevo es gigante. Habría sido infinitamente más difícil haber terminado esto sin ustedes.

A Marce. Infinitas gracias por tu maravillosa compañía y amor en estos últimos años. Eres una persona maravillosa y sé que puedo contar contigo para lo que sea. Estoy muy agradecido por el apoyo y los consejos que me das, y por todas las experiencias y lindos momentos que hemos vivido juntos.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Carlos A. Santiviago y el Dr. Sergio A. Álvarez. El trabajo fue financiado por el proyecto FONDECYT 1171844, dirigido por el Dr. Carlos A. Santiviago.

## PUBLICACIONES

Paulina Fernández, Marcela Zabner, **Jaime Ortega**, Constanza Morgado, Fernando Amaya, Gabriel Vera, Carolina Rubilar, Beatriz Salas, Víctor Cuevas, Camila Valenzuela, Fernando Baisón-Olmo, Sergio A. Álvarez and Carlos A. Santiviago. (2021). “Novel template plasmids pCyaA'-Kan and pCyaA'-Cam for generation of unmarked chromosomal *cyaA'* translational fusion to T3SS effectors in *Salmonella*”. *Microorganisms* 9(3):475.

## PRESENTACIONES EN CONGRESOS INTERNACIONALES

**Jaime Ortega**, Andrea Sabag, Constanza Morgado, Camila Valenzuela, Sergio A. Álvarez y Carlos A. Santiviago. “Contribución de los efectores SipA, SseF y SseG en la supervivencia intracelular de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en *Dictyostelium discoideum*”. XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM 2018), 13 al 16 de noviembre, 2018, Santiago, Chile.

Constanza Morgado, **Jaime Ortega**, Andrea Sabag, Camila Valenzuela, Sergio A. Álvarez y Carlos A. Santiviago. “Rol del efector SseJ en la internalización y supervivencia intracelular de *Salmonella* Typhimurium en la ameba *Dictyostelium discoideum*”. XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM 2018), 13 al 16 de noviembre, 2018, Santiago, Chile.

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

Beatriz Salas, **Jaime Ortega**, Andrea Sabag, Constanza Morgado, Gabriel Vera, Fernando Baisón-Olmo, Sergio A. Álvarez y Carlos A. Santiviago. “Estudio preliminar de la translocación de efectores de *Salmonella enterica* en *Dictyostelium discoideum* mediante fusiones CyaA’”. XXVII Congreso Sociedad Española de Microbiología (SEM 2019), 2 al 5 de julio, 2019, Málaga, España.

## PRESENTACIONES EN CONGRESOS NACIONALES

**Jaime Ortega**, Andrea Sabag, Camila Valenzuela, Ítalo M. Urrutia, Constanza Morgado, Sergio A. Álvarez y Carlos A. Santiviago. “Contribución de los efectores SipA, SseF y SseG en la supervivencia intracelular de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en compartimientos vacuolares de *Dictyostelium discoideum*”. XLI Congreso Chileno de Microbiología, 5 al 8 de noviembre, 2019, Puerto Varas, Chile.

Constanza Morgado, **Jaime Ortega**, Gabriel Vera, Andrea Sabag, Camila Valenzuela, Sergio A. Álvarez y Carlos A. Santiviago. “Caracterización de la secreción del efector SseJ y su rol en la supervivencia intracelular de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en la ameba *D. discoideum*”. XLI Congreso Chileno de Microbiología, 5 al 8 de noviembre, 2019, Puerto Varas, Chile.

Marcela Zabner, Paulina A Fernández, Constanza Morgado, **Jaime Ortega**, Gabriel Vera, Víctor Cuevas, Camila Valenzuela, Sergio A. Álvarez y Carlos A. Santiviago. “Construcción del vector pCLF4-*cyaA'* para la generación de fusiones cromosomales de proteínas efectoras de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium al reportero *CyaA'*”. XLI Congreso Chileno de Microbiología, 5 al 8 de noviembre, 2019, Puerto Varas, Chile.

Marcela Zabner, Paulina Fernández, Constanza Morgado, **Jaime Ortega**, Gabriel Vera, Fernando Baisón-Olmo, Camila Valenzuela, Sergio A. Álvarez y Carlos A. Santiviago. “Generación de fusiones de proteínas efectoras de *Salmonella* Typhimurium al reportero *CyaA'* y detección de su translocación a células eucariontes durante el proceso de infección”. Congreso Digital SOMICH 2020, 2 al 4 de diciembre, 2020, Santiago, Chile.

Gabriel Vera, Andrea Sabag, **Jaime Ortega**, Paulina Fernández, Camila Valenzuela, Sergio A. Álvarez y Carlos A. Santiviago. “La proteína efectora SopF contribuye a la localización intravacuolar y la supervivencia intracelular de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en *Dictyostelium discoideum*”. Congreso Digital SOMICH 2020, 2 al 4 de diciembre, 2020, Santiago, Chile.

Marcela Zabner, Paulina Fernández, Constanza Morgado, **Jaime Ortega**, Gabriel Vera, Fernando Baisón-Olmo, Camila Valenzuela, Sergio A. Álvarez y Carlos A. Santiviago. “Construcción de los vectores pCyaA'-Kan y pCyaA'-Cam para la generación de fusiones cromosomales de proteínas efectoras de *Salmonella* Typhimurium al reportero *CyaA'* y la detección de su translocación a células eucariontes”. 1<sup>er</sup> Congreso de Estudiantes de Posgrado del Campus Eloísa Díaz de la Universidad de Chile - Versión Virtual (CEPCN 2020), 10 al 11 de diciembre, 2020, Santiago, Chile.

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	IX
<b>ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS</b> .....	XI
<b>ABREVIATURAS</b> .....	XIII
<b>RESUMEN</b> .....	XV
<b>ABSTRACT</b> .....	XVIII
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Generalidades de <i>Salmonella</i> .....	1
1.2. Relevancia de los sistemas de secreción de tipo 3 y sus efectores en el mecanismo de infección de <i>Salmonella</i> .....	2
1.3. Interacción de <i>Salmonella</i> con protozoos ambientales .....	7
1.4. <i>Dictyostelium discoideum</i> como organismo modelo para el estudio de la interacción de <i>Salmonella</i> con protozoos .....	8
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	<b>11</b>
<b>3. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>11</b>
<b>4. OBJETIVO ESPECÍFICOS</b> .....	<b>11</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
5.1. Reactivos .....	12
5.2. Cepas bacterianas .....	14
5.3. Líneas celulares eucariontes .....	15
5.4. Plasmidios .....	15
5.5. Partidores .....	16
5.6. Condiciones de cultivo bacteriano .....	17
5.7. Cepas de <i>Dictyostelium discoideum</i> y condiciones de cultivo .....	17
5.8. Extracción de plasmidios .....	18
5.9. Purificación de fragmentos de DNA .....	18
5.10. Electroforesis en gel de agarosa .....	19
5.11. Construcción de mutantes de <i>S. Typhimurium</i> .....	20
5.11.1. Preparación de células bacterianas electrocompetentes y transformación bacteriana .....	20
5.11.2. Preparación de células bacterianas para mutagénesis por reemplazo alélico .....	20
5.11.3. Mutagénesis por intercambio alélico .....	21

5.11.4.	Transducción generalizada con fago P22 .....	22
5.12.	Fusiones génicas a reporteros.....	23
5.12.1.	Fusiones plasmidiales a CyaA'.....	23
5.12.2.	Fusiones cromosomales a CyaA' .....	26
5.13.	Ensayos de infección para determinar supervivencia intracelular en <i>D. discoideum</i> .....	27
5.14.	Producción y secreción de fusiones a CyaA' <i>in vitro</i> .....	29
5.15.	SDS-PAGE y <i>Western blot</i> .....	29
5.16.	Ensayos de infección para determinar translocación de efectores.....	30
5.16.1.	Ensayos de infección para determinar translocación de efectores en células HeLa .....	30
5.16.2.	Ensayos de infección para determinar translocación de efectores en <i>D. discoideum</i> .....	31
5.17.	Ensayo de infección para el monitoreo del compartimento vacuolar en el que reside <i>S. Typhimurium</i> dentro de <i>D. discoideum</i> mediante microscopía confocal .....	32
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
6.1.	Determinar si los efectores SipA, SseF y SseG son requeridos para la supervivencia intracelular de <i>S. Typhimurium</i> en <i>D. discoideum</i> .....	33
6.2.	Determinar si los efectores SipA, SseF y SseG son producidos y secretados intracelularmente en <i>D. discoideum</i> .....	36
6.2.1.	Construcción de fusiones plasmidiales y cromosomales a CyaA'.....	36
6.2.2.	Inmunodetección de fusiones a CyaA' .....	41
6.2.3.	Translocación de las proteínas SipA, SseF y SseG.....	44
6.3.	Contribución de los efectores SipA, SseF y SseG en la capacidad de <i>S. Typhimurium</i> para residir en compartimentos vacuolares dentro de <i>D. discoideum</i> .	47
<b>7.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>49</b>
7.1.	Los efectores SipA, SseF y SseG son importantes para la internalización y supervivencia de <i>S. Typhimurium</i> en <i>D. discoideum</i> .....	49
7.2.	Estudio de la translocación de los efectores SipA, SseF y SseG mediante fusiones al reportero CyaA' .....	51
7.3.	Los efectores SipA, SseF y SseG afectan la capacidad de <i>S. Typhimurium</i> de residir en una estructura vacuolar VatM <sup>+</sup> en <i>D. discoideum</i> .....	56
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>59</b>
<b>9.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>60</b>

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Cepas bacterianas utilizadas en esta tesis .....	14
<b>Tabla 2.</b>	Líneas celulares utilizadas en esta tesis .....	15
<b>Tabla 3.</b>	Plasmidios utilizadas en esta tesis .....	15
<b>Tabla 4.</b>	Oligonucleótidos utilizados en esta tesis .....	16
<b>Tabla 5.</b>	Programa de amplificación para PCR usando partidores H1+P1 y H2+P2.....	21
<b>Tabla 6.</b>	Mezcla de reacción para PCR usando partidores H1+P1 y H2+P2 .....	21
<b>Tabla 7.</b>	Programa de amplificación para PCR de colonias usando partidores Out3 y Out5 .....	22
<b>Tabla 8.</b>	Mezcla de reacción para PCR de colonias usando partidores Out3 y Out5.....	22
<b>Tabla 9.</b>	Programa de amplificación para PCR usando partidores CyaA' .....	24
<b>Tabla 10.</b>	Mezcla de reacción para PCR de colonias usando partidores CyaA' ...	24
<b>Tabla 11.</b>	Mezcla de reacción para ligación en pGEM-T Easy.....	24
<b>Tabla 12.</b>	Mezcla de reacción para digestión de pMMB207-CyaA' y derivados de pGEM-T Easy .....	25
<b>Tabla 13.</b>	Mezcla de reacción para ligación en pMMB207-CyaA' .....	25
<b>Tabla 14.</b>	Programa de amplificación para PCR usando partidores H1+C1 y H2+C2 .....	26
<b>Tabla 15.</b>	Mezcla de reacción para PCR usando partidores H1+C1 y H2+C2.....	26

### FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Ciclo infeccioso de <i>Salmonella</i> .....	2
<b>Figura 2.</b>	Representación esquemática de los T3SS-1 y T3SS-2 y sus efectores	3
<b>Figura 3.</b>	Biogénesis de la vacuola contenedora de <i>Salmonella</i> .....	4
<b>Figura 4.</b>	Microscopía de fluorescencia de <i>D. discoideum</i> infectada con <i>S. Typhimurium</i> .....	9
<b>Figura 5.</b>	Ensayo de internalización y supervivencia intracelular de cepas de <i>S. Typhimurium</i> en <i>D. discoideum</i> .....	28
<b>Figura 6.</b>	Cepas mutantes derivadas de <i>S. Typhimurium</i> 14028s.....	33

<b>Figura 7.</b>	Internalización y supervivencia intracelular de cepas de <i>S. Typhimurium</i> en <i>D. discoideum</i> .....	35
<b>Figura 8</b>	Esquema de la generación de fusiones plasmidiales al reportero <i>CyaA'</i> .....	37
<b>Figura 9.</b>	Confirmación de la inserción de los fragmentos de interés en el vector pGEM-T Easy.....	37
<b>Figura 10.</b>	Digestión de los plasmidios derivados de pGEM-T Easy con las enzimas <i>XhoI</i> y <i>XbaI</i> .....	38
<b>Figura 11.</b>	Confirmación de la inserción de los fragmentos de interés en el vector pMMB207- <i>CyaA'</i> .....	39
<b>Figura 12.</b>	Comprobación de las mutantes de <i>S. Typhimurium</i> 14028s con fusiones cromosomales a <i>cyaA'</i> .....	40
<b>Figura 13.</b>	Inmunodetección en lisados bacterianos de las proteínas de fusión a <i>CyaA'</i> codificadas en los plasmidios pSipA, pSseF y pSseG.....	41
<b>Figura 14.</b>	Inmunodetección en sobrenadantes de cultivos de las proteínas de fusión a <i>CyaA'</i> codificadas en los plasmidios pSipA, pSseF y pSseG.....	42
<b>Figura 15.</b>	Inmunodetección en lisados bacterianos de las proteínas de fusión a <i>CyaA'</i> codificadas en el cromosoma de las cepas <i>sipA-cyaA'</i> , <i>sseF-cyaA'</i> y <i>sseG-cyaA'</i> .....	43
<b>Figura 16.</b>	Medición de la concentración de cAMP en infecciones de células HeLa con cepas de <i>S. Typhimurium</i> que expresan fusiones plasmidiales a <i>CyaA'</i> .....	44
<b>Figura 17.</b>	Medición de la concentración de cAMP en infecciones de células HeLa con cepas de <i>S. Typhimurium</i> que expresan fusiones cromosomales a <i>CyaA'</i> .....	45
<b>Figura 18.</b>	Medición de la concentración de cAMP en infecciones de <i>D. discoideum</i> con cepas de <i>S. Typhimurium</i> que expresan fusiones cromosomales a <i>CyaA'</i> .....	46
<b>Figura 19.</b>	Contribución de los efectores SipA, SseF y SseG en la localización intracelular de <i>S. Typhimurium</i> en compartimientos vacuolares VatM <sup>+</sup> de <i>D. discoideum</i> .....	48

## ABREVIATURAS

°C:	Grados Celsius
μL:	Microlitros
μm:	Micrómetros
μM:	Micromolar
Amp:	Ampicilina
Amp <sup>R</sup> :	Resistencia a ampicilina
APS:	Persulfato de amonio
Cam:	Cloranfenicol
cAMP:	Adenosín monofosfato cíclico
Cam <sup>R</sup> :	Resistencia a cloranfenicol
DMEM:	Medio Eagle modificado por Dulbecco
EBU:	Azul de Evans - Uranina
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA:	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EtOH:	Etanol
FBS:	Suero fetal bovino
g:	Gramos
GFP:	Proteína fluorescente verde
Gm:	Gentamicina
h:	Horas
Kan:	Kanamicina
Kan <sup>R</sup> :	Resistencia a kanamicina
Kb:	Kilobases
KV:	Kilovolts
LB:	Medio Luria-Bertani
M:	Molar
MetOH:	Metanol
mg:	Miligramos
min:	Minutos
mL:	Mililitros
mM:	Milimolar
mm	Milímetros

MOI:	Multiplicidad de infección
ng:	Nanogramos
nm:	Nanómetros
OD <sub>600nm</sub> :	Densidad óptica medida a 600 nanómetros
ORF:	Marco de lectura abierto
O.N.:	<i>Overnight</i>
pb:	Pares de bases
PBS:	Suero fisiológico tamponado con fosfato
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
pg:	Picogramos
p/v:	Peso/volumen
seg:	Segundos
SCV:	Vacuola contenedora de <i>Salmonella</i>
SDS:	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE:	Electroforesis en geles desnaturantes de poliacrilamida
SEM:	Error estándar del promedio
SIFs:	Filamentos inducidos por <i>Salmonella</i>
SPI:	Isla de Patogenicidad de <i>Salmonella</i>
Str:	Estreptomicina
T3SS:	Sistema de secreción de tipo 3
TBS:	Suero fisiológico tamponado con Tris
TAE:	Tris base-acetato-EDTA
TEMED:	N, N, N', N'-Tetrametiletildiamina
UFC:	Unidades formadoras de colonias
V:	Volts
v/v:	Volumen/volumen
x g:	Aceleración gravitacional

## RESUMEN

*Salmonella* es un género de bacterias Gram-negativo responsable de millones de casos de infecciones asociadas a alimentos a nivel mundial. Estas infecciones generan cuadros clínicos que abarcan desde una enteritis autolimitada hasta cuadros infecciosos sistémicos que pueden causar la muerte del hospedero. Su ciclo infectivo contempla el ingreso del patógeno al organismo vía agua o alimentos contaminados, resistiendo el ambiente ácido del estómago y colonizando el intestino delgado. Para su patogenicidad, la bacteria requiere de numerosos factores de virulencia, incluyendo los sistemas de secreción de tipo 3 codificados en las islas de patogenicidad SPI-1 y SPI-2 (T3SS-1 y T3SS-2, respectivamente) y sus proteínas efectoras, los que le permiten infectar las células epiteliales y poder sobrevivir dentro de ellas y de células fagocíticas. Dentro de estas proteínas efectoras se encuentran SipA, SseF y SseG, que participan en la supervivencia intracelular de la bacteria contribuyendo al correcto desarrollo de la “vacuola contenedora de *Salmonella*” en células de mamífero, compartimento que permite la replicación intracelular del patógeno.

Por otra parte, *Salmonella* también suele encontrarse en el medio ambiente, donde interactúa con diferentes protozoos depredadores de bacterias. Naturalmente, la bacteria ha desarrollado estrategias para sobrevivir dentro de estos organismos, quedando protegida de condiciones medioambientales desfavorables y transformando a los protozoos en un importante reservorio ambiental. Incluso, se ha propuesto que la interacción con estos protozoos le ha permitido a *Salmonella* adquirir herramientas para adaptarse al ambiente intracelular de células fagocíticas humanas. A pesar de esto, hasta la fecha se han realizado pocos estudios para caracterizar esta interacción. Al respecto, nuestro grupo reportó que *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) puede sobrevivir dentro de la ameba *Dictyostelium discoideum*, organismo ampliamente usado como modelo de estudio de interacción entre bacterias y protozoos, y que necesita de los T3SS codificados en las islas de patogenicidad SPI-1 y SPI-2 para sobrevivir intracelularmente. Sumado a lo anterior, se observó que la bacteria también reside dentro de una estructura vacuolar dentro de *D. discoideum*.

Considerando lo anterior, en esta tesis investigamos el rol de los efectores SipA, SseF y SseG en la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum* mediante ensayos de infección. También se realizaron ensayos para determinar si estos efectores son producidos y secretados dentro de la ameba. Finalmente, se realizó un seguimiento

mediante microscopía confocal para analizar si los efectores en estudio participan en la capacidad de *S. Typhimurium* para residir dentro de la estructura vacuolar mencionada.

Para evaluar la supervivencia intracelular, se construyeron las cepas mutantes  $\Delta sipA$ ,  $\Delta sseF$ ,  $\Delta sseG$  y  $\Delta sseFG$  derivadas de *S. Typhimurium* 14028s, las que carecen de los genes *sipA*, *sseF*, *sseG*, o de *sseF* y *sseG* simultáneamente. La supervivencia intracelular de cada cepa se evaluó infectando la ameba y determinando el título de bacterias intracelulares a distintos tiempos post infección. Nuestros resultados mostraron que las mutantes  $\Delta sseF$  y  $\Delta sseFG$  presentan una mayor internalización en la ameba en comparación a la cepa silvestre. Además,  $\Delta sipA$  presenta defectos de supervivencia intracelular a 1 h,  $\Delta sseF$  a 3 h,  $\Delta sseG$  a 6 h y  $\Delta sseFG$  a 3 h y 6 h post infección, en comparación a la cepa silvestre. Estos resultados sugieren que los efectores SipA, SseF y SseG contribuyen a la supervivencia de *S. Typhimurium* en *D. discoideum* de manera diferencial durante el transcurso de la infección.

Para evaluar si los efectores en estudio son producidos y secretados intracelularmente en *D. discoideum* se construyeron cepas que presentan una fusión traduccional de cada efector al reportero CyaA', utilizando su actividad adenilato ciclasa dependiente de calmodulina para determinar si los efectores son translocados al citoplasma de *D. discoideum* en el transcurso de una infección. Si bien fue posible inmunodetectar las proteínas de fusión en lisados totales bacterianos y también se pudo detectar actividad adenilato ciclasa de la proteína SipA-CyaA' en un ensayo de infección en células HeLa, no se detectó actividad adenilato ciclasa en infecciones en *D. discoideum*. Estos resultados sugieren que con la metodología escogida no es posible detectar translocación de efectores al citoplasma de *D. discoideum*.

Para analizar si los efectores en estudio participan en la localización de *S. Typhimurium* en un compartimento vacuolar de *D. discoideum*, se infectó una cepa de la ameba que expresa una fusión de la ATPasa vacuolar VatM a GFP con las mutantes  $\Delta sipA$ ,  $\Delta sseF$ ,  $\Delta sseG$  y  $\Delta sseFG$ , que además expresan constitutivamente mCherry. Cada infección se observó en el microscopio confocal a distintos tiempos y se determinó el porcentaje de bacterias que residen dentro de estructuras vacuolares que presentan fluorescencia verde. Nuestros resultados mostraron que luego de 1 h post infección, la cepa  $\Delta sseFG$  reside mayoritariamente fuera de estas estructuras vacuolares en comparación con la cepa silvestre, mientras que luego de 3 h post infección las cepas  $\Delta sseF$  y  $\Delta sseG$  son las que presentan este fenotipo. Finalmente, luego de 6 h post infección ninguna cepa presenta

diferencias con el fenotipo observado en la cepa silvestre. Estas observaciones sugieren que los efectores SseF y SseG contribuyen a la capacidad de la bacteria para residir en compartimentos vacuolares dentro de esta ameba.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis contribuyen a entender de mejor manera los mecanismos por los que *Salmonella* logra sobrevivir intracelularmente en amebas, contribuyendo al posible desarrollo de nuevas estrategias para controlar las infecciones causadas mundialmente por este patógeno.

## ABSTRACT

### **“Contribution of effector proteins SipA, SseF and SseG to the intracellular survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in *Dictyostelium discoideum*”**

*Salmonella* is a genus of Gram-negative bacteria responsible for millions of foodborne illnesses globally. These infections generate clinical manifestations ranging from self-limited enteritis to systemic infections that can lead to the death of the host. The infectious cycle of *Salmonella* begins with the ingestion of the pathogen via contaminated water and food. The pathogen can resist the stomach acidity and then colonizes the small intestine. For these processes the pathogen requires numerous virulence factors, including Type 3 secretion systems that are encoded in the pathogenicity islands SPI-1 and SPI-2 (T3SS-1 and T3SS-2, respectively) and their cognate effector proteins, which grants the bacteria the ability to infect and survive within epithelial cells and phagocytic cells. The effector proteins SipA, SseF and SseG participate in the intracellular survival of this bacteria, contributing to the development of the “*Salmonella*-containing vacuole” in mammal cells, a compartment that allows intracellular replication of the pathogen.

Although *Salmonella* is an intracellular pathogen, it spends a substantial part of its life cycle in the environment interacting with different predatory protozoa that feed on bacteria. As one may expect, the bacterium has developed strategies to survive inside these organisms, being protected from adverse environmental conditions. As a result, protozoa may act as environmental reservoirs for this pathogen. It has been proposed that this interaction has allowed *Salmonella* to acquire molecular mechanisms to adapt to the intracellular environment of human phagocytic cells. However, only a few studies have been conducted up to date in order to characterize this interaction. In spite of this, our laboratory reported that *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) is able to survive inside the social amoeba *Dictyostelium discoideum*, a model organism widely used to study amoeba-bacteria interaction, and requires T3SS-1 and T3SS-2 for this process. Additionally, we observed that the pathogen resides within vacuolar structures in *D. discoideum*.

In this thesis we studied the role played by SipA, SseF and SseG in the intracellular survival of *S. Typhimurium* in *D. discoideum* by infection assays. We also determined if these effectors are produced and secreted inside the amoeba. Finally, we analyzed by confocal

microscopy whether the effectors under study participate in the ability of *S. Typhimurium* to reside within the aforementioned vacuolar structure in *D. discoideum*.

To evaluate intracellular survival,  $\Delta sipA$ ,  $\Delta sseF$ ,  $\Delta sseG$  and  $\Delta sseFG$  mutant strains derived from *S. Typhimurium* 14028s were constructed. Intracellular survival of each strain was assessed by infecting the amoeba and calculating the intracellular bacterial titer at different postinfection times. Our results showed that mutants  $\Delta sseF$  and  $\Delta sseFG$  exhibit increased internalization in the amoeba as compared with the wild-type strain. In addition,  $\Delta sipA$  exhibits intracellular survival defects at 1 h,  $\Delta sseF$  at 3 h,  $\Delta sseG$  at 6 h and  $\Delta sseFG$  at 3 h and 6 h post infection, as compared with the wild-type strain. These results suggest that effector proteins SipA, SseF and SseG contribute to *S. Typhimurium* survival within *D. discoideum* during infection.

To assess whether the studied effector proteins are produced and secreted intracellularly in *D. discoideum*, we constructed mutant strains that carry a translational fusion of the effectors to the CyaA' reporter and used its calmoduline-dependent adenylate cyclase activity to determine whether the effectors are translocated into the cytoplasm of *D. discoideum* during infection. While it was possible to immunodetect the fusion proteins in whole-cell lysates, and to detect adenylate cyclase activity of the SipA-CyaA' fusion protein in infected HeLa cells, we were not able to detect adenylate cyclase activity in *D. discoideum* infections. These results suggest that it is not possible to detect translocation of effectors to the cytoplasm of *D. discoideum* with the chosen methodology.

To analyze whether the effectors under study participate in the localization of *S. Typhimurium* in a vacuolar compartment in *D. discoideum*, a strain of the amoeba carrying a fusion of the vacuolar ATPase VatM to GFP was infected with  $\Delta sipA$ ,  $\Delta sseF$ ,  $\Delta sseG$  and  $\Delta sseFG$  mutants, which also carry a plasmid that allows the constitutive expression of the mCherry protein. Each infection was monitored by confocal microscopy at different infection times and the percentage of bacteria within vacuolar structures exhibiting green fluorescence was determined. Our results showed that the strain  $\Delta sseFG$  mostly resides outside the vacuolar structure at 1 h post infection. At 3 h post infection, the strains  $\Delta sseF$  and  $\Delta sseG$  showed this phenotype. Finally, at 6 h post infection no strains show differences in comparison to the wild-type strain. These observations suggest that effectors SseF and SseG contribute to the ability of the bacterium to reside in vacuolar compartments within this amoeba.

Overall, the results obtained in this thesis contribute to a better understanding of the mechanisms by which *Salmonella* survive intracellularly in amoebae, contributing to the possible development of novel strategies to control the infections caused by this pathogen worldwide.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Generalidades de *Salmonella*

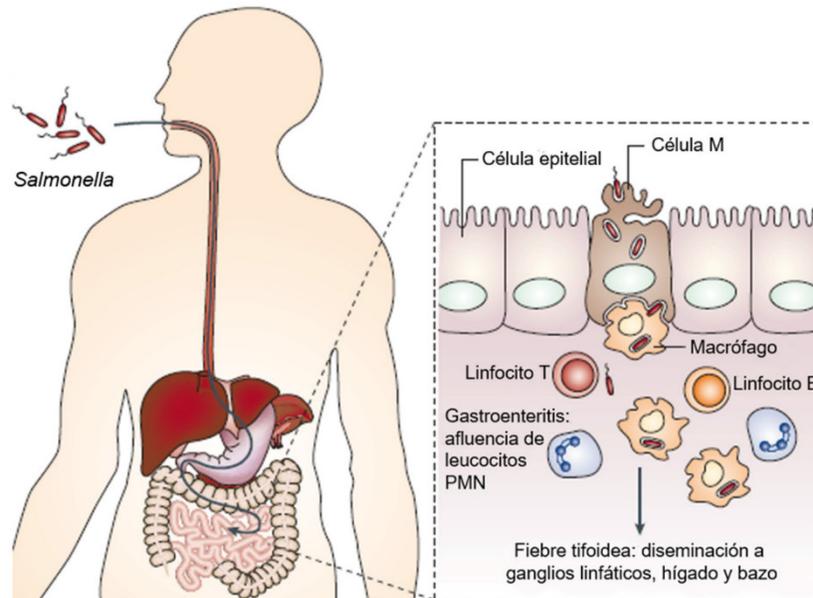
El género *Salmonella* corresponde a un conjunto heterogéneo de bacterias Gram negativo en el cual se pueden distinguir más de 2500 serovares según el esquema de serotipificación de Kauffman-White, que se basa principalmente en variaciones antigénicas del lipopolisacárido (antígeno O) y el flagelo (antígeno H) (Canals et al., 2011). El género *Salmonella* se divide en dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, la cual a su vez se divide en 6 subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (Brenner et al., 2000).

Los serovares de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* son responsables de un ~99% de los casos mundiales de salmonelosis en animales de sangre caliente, mientras que *S. bongori* y las otras subespecies de *S. enterica* son principalmente microorganismos comensales en animales de sangre fría, aunque también causan infecciones en el ser humano de manera ocasional (Canals et al., 2011).

*Salmonella* es responsable de cientos de millones de casos de salmonelosis a nivel mundial, causando la muerte en cientos de miles de afectados por las diversas patologías ocasionadas por el microorganismo. Entre los principales cuadros patológicos que puede causar *Salmonella* se encuentra la fiebre tifoidea, que corresponde a una enfermedad sistémica causada por serovares tifoideos, y la enteritis, causada por serovares no tifoideos. Cabe destacar que los serovares no tifoideos también pueden causar patologías sistémicas, en especial cuando la infección ocurre en sujetos inmunocomprometidos (Canals et al., 2011).

Al ser un patógeno que se transmite por vía fecal-oral, el ciclo infeccioso de *Salmonella* (**Figura 1**) comienza con la ingestión del microorganismo por parte del hospedero, usualmente desde agua o alimentos contaminados. Una vez en el organismo, *Salmonella* sobrevive al pH ácido del estómago y posteriormente coloniza el tracto intestinal. En el intestino delgado la bacteria invade el epitelio, gana acceso al subepitelio y es fagocitada por macrófagos residentes, en los que sobrevive y utiliza como vehículos para diseminarse en el hospedero a través del sistema reticuloendotelial, causando las patologías sistémicas. Por otra parte, la enteritis causada por este patógeno se debe a la respuesta inflamatoria local generada en el intestino, provocada por la infiltración de leucocitos polimorfonucleares

(PMN) y la secreción de diferentes citoquinas proinflamatorias, que tienen como resultado la destrucción de la capa mucosa (Coburn et al., 2007; Haraga et al., 2008; Bueno et al., 2012).



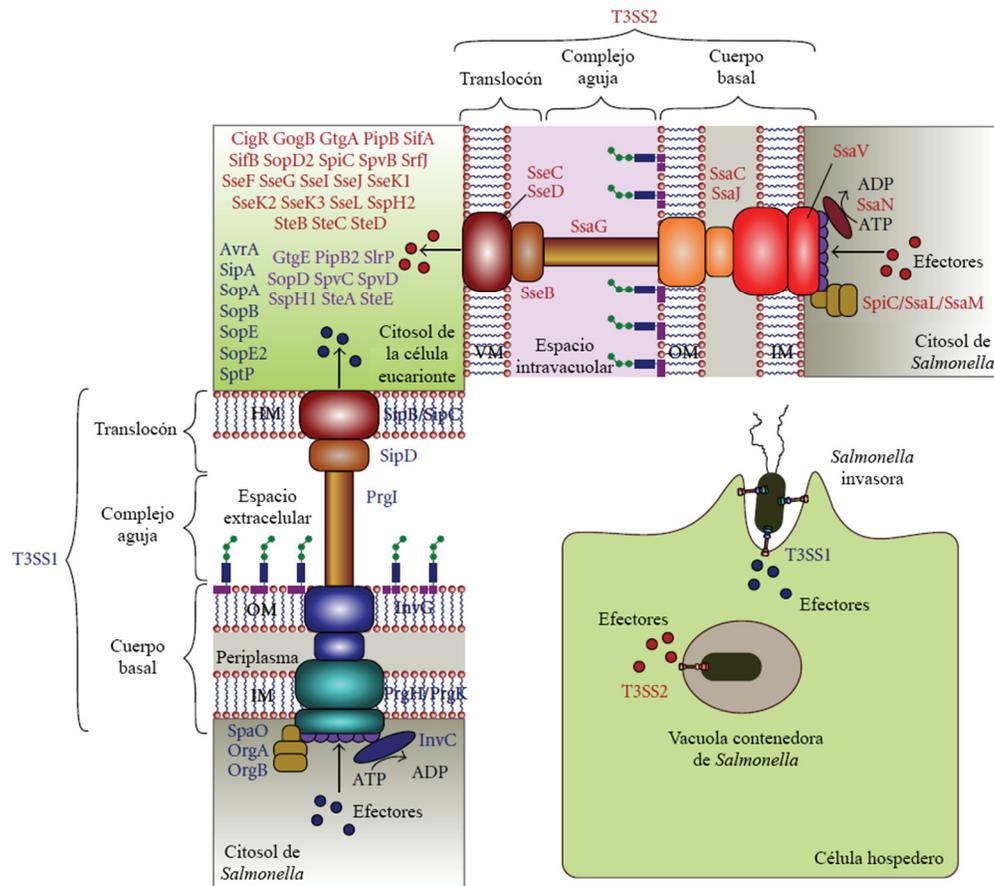
**Figura 1. Ciclo infeccioso de *Salmonella*.** Una vez ingerida, *Salmonella* puede sobrevivir al pH ácido del estómago y colonizar el tracto intestinal. En el intestino delgado, *Salmonella* logra cruzar la barrera epitelial a través de las células M. En el subepitelio intestinal, *Salmonella* interactúa con células fagocíticas del sistema inmune, como macrófagos, siendo capaz de sobrevivir dentro de ellos y utilizarlos como vehículo de diseminación sistémica. Adaptado de Haraga et al., 2008.

## 1.2. Relevancia de los sistemas de secreción de tipo 3 y sus efectores en el mecanismo de infección de *Salmonella*

Entre los principales determinantes de virulencia de *Salmonella* destacan ciertos elementos genéticos de gran tamaño, ubicados principalmente dentro de su cromosoma, que codifican factores importantes para su interacción con el hospedero. Estos elementos genéticos se denominan Islas de Patogenicidad de *Salmonella* (SPIs), varias de las cuales se encuentran conservadas en los diferentes serovares de *Salmonella* (Marcus et al., 2000). Hasta el momento se han descrito más de 23 SPIs en el género *Salmonella*, siendo las islas SPI-1 a la SPI-5 las que se encuentran presentes en la mayoría de los serovares de *S. enterica* (Desai et al., 2013).

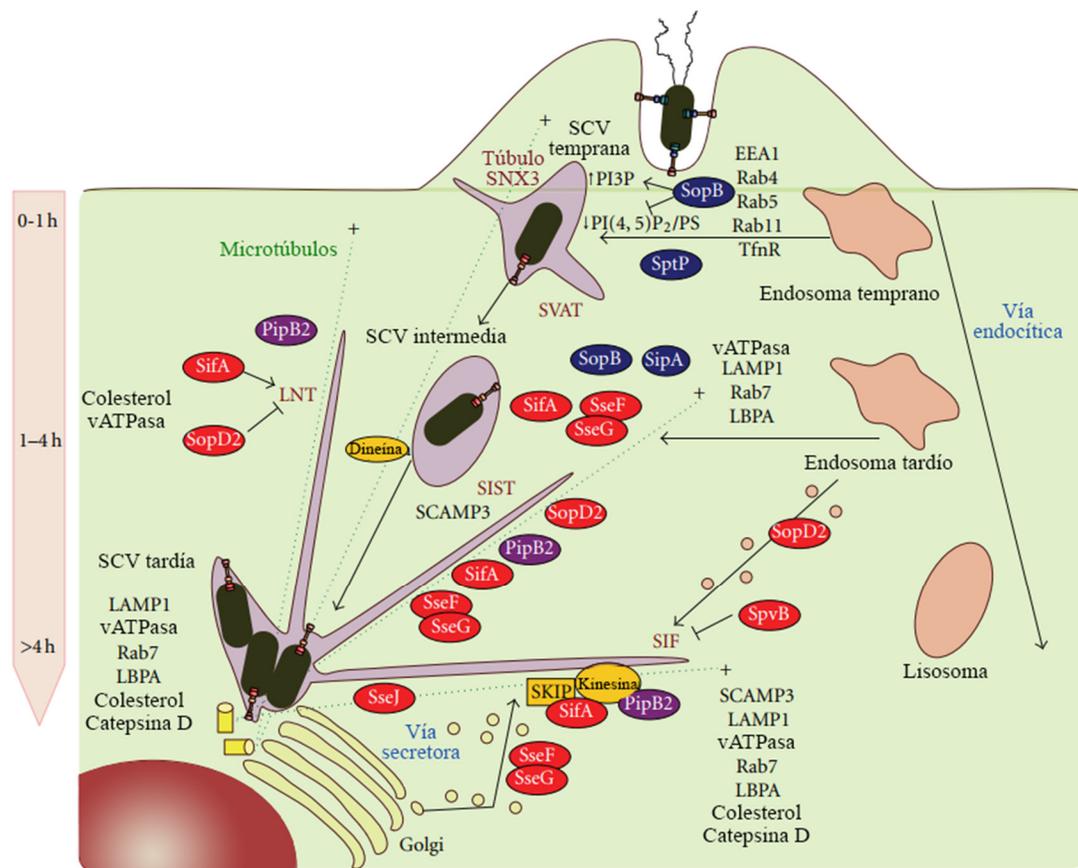
Las islas SPI-1 y SPI-2 son de especial importancia, ya que ambas codifican sistemas de secreción de tipo 3 (T3SS) que son esenciales para la patogenicidad de *Salmonella* (Figura 2). Los T3SS corresponden a sistemas especializados que median la transferencia

de proteínas de virulencia, conocidas como “efectores”, desde la bacteria hacia el citoplasma de las células del hospedero (Haraga et al., 2008). El T3SS codificado en la isla SPI-1 (T3SS-1) se activa cuando existe contacto con las células epiteliales, translocando sus efectores a través de la membrana plasmática de las células del hospedero. Por su parte, el T3SS codificado en la isla SPI-2 (T3SS-2) se activa intracelularmente en respuesta a pH moderadamente ácido y a privación de nutrientes, translocando sus efectores a través de la membrana de la “vacuola contenedora de *Salmonella*” (SCV). Esta última es una importante estructura que se forma luego de la entrada de *Salmonella* en las células del hospedero y sirve como nicho para su supervivencia y replicación intracelular (van der Heijden et al., 2012).



**Figura 2. Representación esquemática de los T3SS-1 y T3SS-2 y sus efectores.** IM: Membrana interna de la bacteria; OM: Membrana externa de la bacteria; HM: Membrana plasmática del hospedero; VM: Membrana vacuolar. Los componentes y efectores secretados por el T3SS-1 se muestran en azul. Los componentes y efectores secretados por el T3SS-2 se muestran en rojo. Los efectores secretados por ambos sistemas de secreción se muestran en púrpura. Adaptado de Ramos-Morales, 2012.

La biogénesis de la SCV se puede separar en 3 etapas: temprana (menos de 1 h post infección), intermedia (de 1 a 4 h post infección) y tardía (más de 4 h post infección) (Malik-Kale et al., 2011), las que se muestran en la **Figura 3**. En su etapa inicial de formación, la SCV adquiere marcadores tempranos de la vía endosomal en su membrana, los cuales son reemplazados por proteínas de membrana asociadas a lisosomas (LAMPs) luego de 20 minutos de infección y que se mantienen durante horas. Además de las LAMPs, los marcadores CD63, el precursor de la fosfatasa ácida lisosomal (LAP), vATPasa y catepsina D se asocian a la membrana de la SCV en la etapa tardía de su formación. También se ha descrito que existiría una asociación entre la SCV y el retículo endoplásmico, como sucede con la vía endosomal (Knodler et al., 2003).



**Figura 3. Biogénesis de la vacuola contenedora de *Salmonella*.** La figura muestra la maduración de SCV y las diferentes proteínas efectoras que participan en este proceso. La etapa inicial (0-1 h) está controlada por los efectores del T3SS-1 (en azul) SopB y SptP. En la etapa intermedia (1-4 h), la SCV se moviliza hasta tener una posición perinuclear, proceso en el que participan los efectores del T3SS-1 (en azul) SipA y SopB, y los efectores del T3SS-2 (en rojo) SifA, SseF y SseG. Entre las 4 y 6 h post infección se inicia la replicación intracelular y la formación de diferentes estructuras filamentosas. Dentro de este proceso participan diversos efectores del T3SS-2 y efectores que se secretan por ambos T3SSs (en púrpura). Adaptado de Ramos-Morales, 2012.

La formación, mantención y posicionamiento correcto de la SCV dentro de las células del hospedero es de suma importancia para la supervivencia intracelular de *Salmonella* (Creasey & Isberg, 2014). Estos procesos están controlados directamente por ambos T3SS y sus correspondientes efectores. Entre los efectores importantes para la biogénesis de la SCV se encuentra SopB, que es secretado por el T3SS-1 y es responsable de la disminución del nivel de PIP<sub>2</sub> y la acumulación de PIP<sub>3</sub> en la membrana de la SCV, procesos necesarios en la etapa temprana de su formación (Terebiznik et al., 2002). En la etapa intermedia de la formación de la SCV son de importancia los efectores SopB y SipA (secretados por el T3SS-1) y SifA, SseF y SseG (secretados por el T3SS-2). Estos últimos participan en la movilización de la SCV a través de los microtúbulos para que alcance una posición perinuclear, adyacente al centro organizador de microtúbulos. Finalmente, en la etapa tardía de formación de la SCV participan, principalmente, efectores secretados por el T3SS-2, como PipB2, SifA, SopD2, SseF y SseG. Estos efectores son responsables de la formación de estructuras conocidas como “filamentos inducidos por *Salmonella*” (SIFs) en las células del hospedero, cuya formación se correlaciona con la iniciación de la replicación bacteriana dentro de células epiteliales del hospedero (Stein et al., 1996) y la mantención del posicionamiento de la SCV (Ramos-Morales, 2012).

SipA es uno de los primeros efectores secretados por *Salmonella* cuando la bacteria entra en contacto con su célula hospedera (McIntosh et al., 2017). Una vez que la proteína ingresa a la célula eucarionte, es procesada por caspasa 3 en un dominio N-terminal y uno C-terminal (McIntosh et al., 2017). Se ha descrito que el dominio N-terminal funciona como una proteína R-SNARE y que forma un complejo SNARE funcional con sintaxina 8, sintaxina 13 y sintaxina 7, permitiendo que la SCV se fusione con endosomas tempranos, evadiendo su degradación lisosomal (Singh et al., 2018). Por otra parte, el dominio C-terminal participa en la reorganización del citoesqueleto de actina, proceso necesario para la invasión de células epiteliales. La interacción de SipA con actina es directa y en relación 1:1, y se ha observado que el efector inhibe la despolarización de actina, estabilizando los filamentos y promoviendo la internalización de *Salmonella* por las células del hospedero (Zhou et al., 1999). Se ha observado que SipA coopera con el efector SipC promoviendo la polimerización de actina y el reordenamiento del citoesqueleto en modelos *in vivo* (McGhie et al., 2001). Junto con su efecto sobre la polimerización de actina y la ondulación de membrana, SipA también es importante para la correcta formación y posicionamiento de la SCV. De hecho, se ha observado que al eliminar el gen que codifica este efector en *S. Typhimurium* existe un posicionamiento periférico de las SCVs en las

células del hospedero, mientras que al complementar la mutante en *trans* se restaura el posicionamiento perinuclear de las SCVs. Además, en la misma mutante se observó que las SCVs se mantienen intactas, pero poseen menos bacterias en su interior con respecto a la cepa silvestre (Brawn et al., 2007).

Los efectores SseF y SseG están codificados en la isla SPI-2 y son secretados por el T3SS-2 (Kuhle & Hensel, 2002; Hansen-Wester et al., 2002). Ambos efectores regulan la correcta formación de los SIFs al controlar la agregación de compartimientos endosomales a estos filamentos (Guy et al., 2000). Además, los efectores SseF y SseG cumplen un papel destacado durante la generación y maduración de la SCV. Por ejemplo, SseF controla el correcto posicionamiento de la SCV, lo que a su vez es importante para la supervivencia intracelular del patógeno. De hecho, se ha reportado que en una mutante  $\Delta sseF$  de *S. Typhimurium* se produce una menor recuperación de bacterias intracelulares a partir de células infectadas, fenotipo que se revierte al realizar la complementación en *trans* de la mutante (Abrahams et al., 2006). Para que exista un correcto posicionamiento de la SCV es necesaria dineína funcional, ya que al inhibir su actividad no se observa la formación de microcolonias perinucleares en células HeLa, fenotipo que indica un correcto posicionamiento de la SCV. Se ha observado que SseF interactúa con dineína y que al eliminar el gen *sseF* de *S. Typhimurium* se produce un fenotipo similar al que causa la pérdida de actividad de la dineína, por lo que SseF regularía el posicionamiento de la SCV al reclutar y modular la actividad de dineína (Abrahams et al., 2006). Por otra parte, la importancia del efector SseG radica en que controla la interacción de la SCV con el aparato de Golgi, ya que al eliminar el gen *sseG* de *S. Typhimurium* no se observa una asociación de las bacterias con membranas del organelo, situación que se revierte al complementar en *trans* la mutante (Salcedo & Holden, 2003). SseG colocaliza con LAMP-1, proteína que se encuentra en la membrana de la SCV (Salcedo & Holden., 2003). Al realizar ensayos de replicación intracelular con una cepa mutante  $\Delta sseG$  de *S. Typhimurium*, se observó una disminución de 40 veces en la cantidad de bacterias intracelulares en comparación con la cepa silvestre y la cepa complementada en *trans*, indicando que la interacción de la SCV con el aparato de Golgi es necesaria para la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* (Salcedo & Holden, 2003). En concordancia con lo anterior, al tratar las células infectadas con brefeldina A, compuesto que inhibe la función del aparato de Golgi, se observan efectos en la supervivencia bacteriana que son similares a los que presenta la mutante  $\Delta sseG$  de *S. Typhimurium* (Salcedo & Holden, 2003). Adicionalmente, se ha observado que los

efectores SseF y SseG se unen a la proteína ACBD3 ubicada en la membrana del aparato de Golgi en células epiteliales, permitiendo el anclaje entre este organelo y la SCV (Yu et al., 2016).

### **1.3. Interacción de *Salmonella* con protozoos ambientales**

Aunque *Salmonella* se considera como un patógeno intracelular, durante su ciclo de vida también puede encontrarse en el medio ambiente. Aquí la bacteria debe ser capaz de sobrevivir a la depredación de organismos ambientales. Como es de esperarse, durante la evolución muchas bacterias patógenas han desarrollado diferentes mecanismos para escapar de la depredación y sobrevivir dentro de estos organismos, lo que también las protegería de condiciones adversas propias del medio ambiente. El estudio de la interacción entre patógenos bacterianos y protozoos comenzó cuando se descubrió que *Legionella pneumophila* es capaz de sobrevivir dentro de amebas del género *Acanthamoeba* (Rowbotham, 1980). Posteriormente, se observó que cepas de *L. pneumophila* recuperadas desde *Acanthamoeba castellanii* poseen una mayor capacidad infectiva en ratones (Cirillo et al., 1999) y que esta bacteria utiliza el mismo repertorio de genes para sobrevivir y replicarse en macrófagos humanos y en *A. castellanii* (Segal & Shuman, 1999), potenciando la importancia del estudio de la relación entre bacterias patógenas y amebas. Adicionalmente, se ha estudiado la interacción de *Acanthamoeba* con otros patógenos bacterianos como *Mycobacterium avium*, *Chlamydia pneumoniae*, *Burkholderia cepacia* y *Escherichia coli* (Cirillo et al., 1997; Essig et al., 1999; Marolda et al., 1999; Barker et al., 1999).

En el caso de *Salmonella*, los estudios de su interacción con protozoos comenzaron cuando se observó que *S. Typhimurium* puede replicarse dentro de *Acanthamoeba polyphaga*, específicamente en sus vacuolas contráctiles (Gaze et al., 2003). Estudios subsiguientes han demostrado que *S. Thompson* puede escapar de la depredación por protozoos ambientales del género *Tetrahymena*, al mantenerse viable dentro de vesículas en este organismo. Además, esta interacción protegería a las bacterias de la actividad tóxica del hipoclorito (Brandl et al., 2005). De manera similar, se ha observado que *S. Dublin* puede replicarse intracelularmente en *A. rhyodes* y que esta replicación es dependiente del plasmidio de virulencia de *Salmonella* y de HilA, factor transcripcional que regula la expresión de genes de la SPI-1 (Tezcan-Merdol et al., 2004). Entre otras investigaciones acerca del tema, se ha descrito que protozoos depredadores como *Naelgeria* y *Acanthamoeba* pueden distinguir y seleccionar entre distintos serovares de *Salmonella*

mediante el reconocimiento de su antígeno O (Wildschutte & Lawrence, 2007). También se ha descrito que *S. Thompson* es capaz de sobrevivir en *Tetrahymena pyriformis* y en ciliados del género *Glaucoma* (Gourabathini et al., 2008).

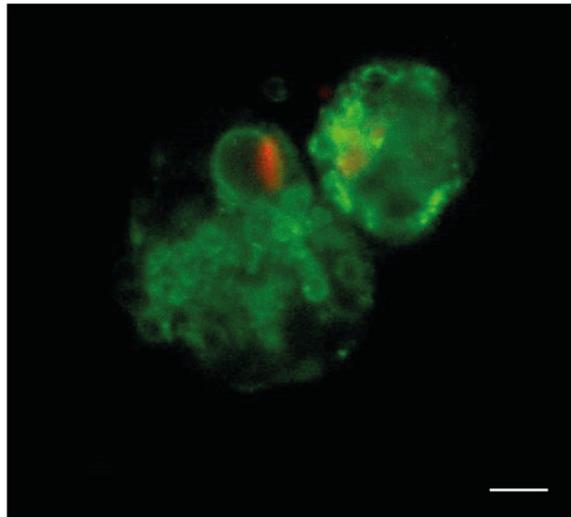
Con respecto al rol de los efectores codificados en las islas SPI-1 y SPI-2 en la interacción con protozoos, se ha reportado un aumento en la expresión de los genes *sipC* (perteneciente a la SPI-1) y *sseC* (perteneciente a la SPI-2) luego de infectar *A. polyphaga* con *S. Typhimurium*. Esta inducción sería diferencial en el tiempo, ya que luego de 1 h de infección los niveles de transcritos de *sseC* y de *sipC* aumentan significativamente. Adicionalmente, bajo las mismas condiciones se reporta un aumento drástico en la transcripción de *sseC* luego de 4 h de infección, sugiriendo que el efector que codifica es importante para la supervivencia intracelular de la bacteria (Bleasdale et al., 2009). A su vez, el perfil transcripcional de *S. Typhimurium* recuperada desde fagosomas de *Tetrahymena* muestra un aumento en la expresión de los genes *sifB* y *sopB*, que codifican efectores secretados por el T3SS-2, junto con otros genes importantes para la formación de la SCV (Rehfuss et al., 2011). A pesar de estos reportes, hasta el momento se han realizado muy pocos estudios relacionados con los mecanismos moleculares involucrados en la supervivencia intracelular de *Salmonella* en amebas y el papel que cumplirían en este proceso los efectores secretados por T3SS-1 y T3SS-2.

#### **1.4. *Dictyostelium discoideum* como organismo modelo para el estudio de la interacción de *Salmonella* con protozoos**

Un modelo para el estudio de la interacción patógeno-hospedero que ha tomado fuerza en la comunidad científica corresponde a *Dictyostelium discoideum* (Steinert, 2011). *D. discoideum* es una ameba social que puede encontrarse en suelos de bosque y hojas caídas, donde crece unicelularmente siempre y cuando exista una cantidad suficiente de bacterias para alimentarse. Una vez que los nutrientes escasean, las amebas unicelulares comienzan un ciclo de desarrollo social, formando agregados que posteriormente se diferencian a distintos tejidos que conforman un organismo pluricelular (Eichinger, 2003). Entre las características importantes de este organismo que permiten su utilización como modelo de estudio destaca la facilidad para ser cultivado en el laboratorio y la disponibilidad de su genoma secuenciado (Bozzaro & Eichinger, 2011). También existe una base de datos centralizada, llamada dictyBase (<http://dictybase.org/>), que permite el fácil acceso a la información disponible acerca de la ameba, además de una variedad de cepas y herramientas genéticas que facilitan el estudio en este modelo. Entre los procesos celulares

que pueden ser estudiados en *D. discoideum* se encuentran: fagocitosis, macropinocitosis, motilidad celular, quimiotaxis y transducción de señales, entre otros (Duhon & Cardelli, 2002; Bozzaro & Eichinger, 2011).

Inicialmente, se informó que cuando *S. Typhimurium* era fagocitada por *D. discoideum* se localizaba en estructuras vacuolares dentro de la ameba y se reportó que *S. Typhimurium* era degradada a partir de las 3 h post infección en esta ameba, observándose una disminución casi completa en la replicación intracelular de la bacteria (Skriwan et al., 2002). Posteriormente, se descubrió que al mutar genes importantes para el proceso de la autofagia en *D. discoideum*, *S. Typhimurium* sobrevivía intracelularmente en esta ameba, sugiriendo que la supervivencia intracelular de la bacteria es controlada mediante la vía autofágica (Jia et al., 2009). Unos años más tarde, se observó que *S. Typhimurium* retarda el desarrollo social de la ameba mediante un mecanismo dependiente del T3SS-2 (Sillo et al., 2011) y que la bacteria puede sobrevivir intracelularmente en el protozoo al menos por 6 h (Frederiksen & Leisner, 2015). Recientemente, resultados de nuestro laboratorio indicaron que *S. Typhimurium* requiere de los T3SS-1 y T3SS-2 para sobrevivir intracelularmente en *D. discoideum* (Riquelme et al., 2016) y confirmaron que este patógeno reside dentro de estructuras vacuolares intracelulares (**Figura 4**) luego de ser fagocitada por esta ameba (Valenzuela et al., 2021). Estas observaciones sugieren que los efectores secretados por estos T3SS cumplen un papel importante en la evasión de la fagocitosis y la supervivencia intracelular de *Salmonella* en *D. discoideum*.



**Figura 4. Microscopía de fluorescencia de *D. discoideum* infectada con *S. Typhimurium*.** En la imagen se puede ver a *S. Typhimurium* dentro de una estructura vacuolar de *D. discoideum* a las 4,5 h post infección. La fluorescencia verde corresponde a vacuolas VatM<sup>+</sup> de la ameba y la fluorescencia roja corresponde al patógeno. Adaptado de Valenzuela et al., 2021. Barra = 2  $\mu$ m.

Considerando los antecedentes mencionados, en este trabajo de investigación nos propusimos determinar la importancia de los efectores SipA, SseF y SseG en la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en la ameba social *D. discoideum* y en la capacidad que tiene la bacteria para residir en una estructura vacuolar dentro de la ameba.

## **2. HIPÓTESIS**

Los efectores SipA, SseF y SseG de *Salmonella* Typhimurium son producidos y secretados intracelularmente en *Dictyostelium discoideum* y contribuyen en la supervivencia intracelular del patógeno en un compartimiento vacuolar en la ameba.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Determinar si los efectores SipA, SseF y SseG de *Salmonella* Typhimurium son producidos y secretados intracelularmente en *Dictyostelium discoideum* y si contribuyen en la supervivencia intracelular del patógeno en un compartimiento vacuolar en la ameba.

## **4. OBJETIVO ESPECÍFICOS**

1.- Determinar si los efectores SipA, SseF y SseG participan en la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*.

2.- Determinar si los efectores SipA, SseF y SseG son producidos y secretados intracelularmente en *D. discoideum*.

3.- Determinar si los efectores SipA, SseF y SseG participan en la localización de *S. Typhimurium* en un compartimiento vacuolar en *D. discoideum*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Reactivos

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

De **Arbor Assays Inc** (ME, USA) se obtuvo: sistema comercial para la medición de cAMP “*DetectX Direct Cyclic AMP Enzyme Immunoassay Kit*”.

De **Bio-Rad, Inc** (CA, USA) se obtuvo: solución 40% acrilamida/bis-acrilamida, tampón de muestra de Laemmli 4x, solución de bloqueo, sistema de electroforesis en geles “*Mini-Protean III*”, sistema de transferencia “*Mini Trans-Blot*”, electroporador “*E. coli Pulser*”.

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

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

De **Cell Signaling Technology, Inc** (MA, USA) se obtuvo: anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (HRP).

De **Corning Inc** (NY, USA) se obtuvo: suero fisiológico tamponado con fosfato (PBS).

De **Difco Laboratories** (MI, USA) se obtuvo: casaminoácidos.

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

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

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

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

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

De **Merck** (NJ, USA) se obtuvo: cloruro de sodio (NaCl), sulfato de magnesio heptahidratado ( $MgSO_4 \times 7H_2O$ ), ácido cítrico monohidratado ( $C_6H_8O_7 \times H_2O$ ), acetato de sodio ( $CH_3COONa$ ), glucosa, cloroformo, cloruro de potasio (KCl), cloruro de magnesio hexahidratado ( $MgCl_2 \times 6H_2O$ ), glicerol, ácido clorhídrico fumante, isopropanol, acetona, hidróxido de sodio (NaOH), amoníaco 25%, etanol absoluto, fosfato dipotásico trihidratado

( $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ ), fosfato monopotásico ( $KH_2PO_4$ ), sulfato de amonio ( $(NH_4)_2SO_4$ ), sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ ), fosfato disódico ( $Na_2HPO_4$ ), carbonato de sodio ( $Na_2CO_3$ ), azul de Evans, metanol, peptona, extracto de levadura, solución amortiguadora TAE 50x, membranas de PVDF Immobilon-P, Triton X-100 y filtros Millipore con poros de 0,22  $\mu m$  de diámetro.

De **New England Biolabs** (Ipswich, MA, USA) se obtuvo: estándares de peso molecular de DNA de 100 pb y 1 Kb para electroforesis de ácidos nucleicos, *Phusion High-Fidelity* DNA polimerasa y T4 DNA ligasa.

De **Promega** (WI, USA) se obtuvo: desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) para PCR, enzimas de restricción *XbaI* y *XhoI*, sistema comercial de clonamiento pGEM-T Easy y *GoTaq* DNA polimerasa.

De **Qiagen** (CA, USA) se obtuvo: sistema comercial para purificación de productos de PCR "*QIAquick PCR Purification Kit*", sistema comercial para purificación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa "*QIAquick Gel Extraction Kit*" y sistema comercial para extracción de DNA plasmidial "*QIAprep Spin Miniprep Kit*".

De **Santa Cruz Biotechnology, Inc** (CO, USA) se obtuvo: anticuerpo primario anti-CyaA' de ratón.

De **Sigma Chemical Co.** (MO, USA) se obtuvo: kanamicina, ampicilina, gentamicina, estreptomina, L-arabinosa, azul de bromofenol, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), uranina,  $\beta$ -mercaptoetanol y sistema comercial para extracción de DNA genómico "*GenElute Bacterial Genomic DNA Kit*".

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

De **Thermo Fisher Scientific** (MA, USA) se obtuvo: solución antibiótica/antimicótica 100x, estándar de proteínas "*PageRuler*" y reactivo "*Supersignal West-Femto*".

## 5.2. Cepas bacterianas

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

**Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en esta tesis.**

Cepa bacteriana	Característica	Origen
<b><i>Salmonella Typhimurium</i></b>		
14028s	Cepa silvestre virulenta	Stock del laboratorio
$\Delta sipA$	14028s $\Delta sipA::aph$ (Kan <sup>R</sup> )	Este trabajo
$\Delta sseF$	14028s $\Delta sseF::aph$ (Kan <sup>R</sup> )	Este trabajo
$\Delta sseG$	14028s $\Delta sseG::aph$ (Kan <sup>R</sup> )	Este trabajo
$\Delta sseFG$	14028s $\Delta sseFG::aph$ (Kan <sup>R</sup> )	Este trabajo
$\Delta aroA$	14028s $\Delta aroA::aph$ (Kan <sup>R</sup> )	Stock del laboratorio
WT/pSipA	14028s transformada con pSipA	Este trabajo
WT/pSseF	14028s transformada con pSseF	Este trabajo
WT/pSseG	14028s transformada con pSseG	Este trabajo
WT/pSseK1	14028s transformada con pSseK1	Stock del laboratorio
WT/pFCcGi	14028s transformada con pFCcGi	Este trabajo
$sipA-cyaA'$	14028s $sipA::cyaA'$	Este trabajo
$sseF-cyaA'$	14028s $sseF::cyaA'$	Este trabajo
$sseG-cyaA'$	14028s $sseG::cyaA'$	Este trabajo
$\Delta sipA/pFCcGi$	14028s $\Delta sipA::aph$ (Kan <sup>R</sup> ) transformada con pFCcGi	Este trabajo
$\Delta sseF/pFCcGi$	14028s $\Delta sseF::aph$ (Kan <sup>R</sup> ) transformada con pFCcGi	Este trabajo
$\Delta sseG/pFCcGi$	14028s $\Delta sseG::aph$ (Kan <sup>R</sup> ) transformada con pFCcGi	Este trabajo
$\Delta sseFG/pFCcGi$	14028s $\Delta sseFG::aph$ (Kan <sup>R</sup> ) transformada con pFCcGi	Este trabajo
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	$\Phi 80lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169 deoR phoA supE44 recA1 endA1 hsdR17(rK^-, mK^+) thi-1 gyrA96 relA1$	Stock del laboratorio
B/r (DBS0348878)	Cepa silvestre	dictyBase
<b><i>Klebsiella aerogenes</i></b>		
DBS0349838	Cepa silvestre	dictyBase

### 5.3. Líneas celulares eucariontes

Todas las líneas celulares eucariontes utilizadas en esta tesis se detallan en la **Tabla 2**.

**Tabla 2. Líneas celulares utilizadas en esta tesis.**

Línea celular	Característica	Origen
<i>Dictyostelium discoideum</i> AX4 (DBS0302402)	Cepa silvestre axénica ( <i>axeA1</i> , <i>axeB1</i> , <i>axeC1</i> )	dictyBase
<i>Dictyostelium discoideum</i> AX2 VatM-GFP (DBS0235537)	Cepa derivada de AX2 que expresa VatM fusionado a GFP (G418 <sup>R</sup> )	dictyBase
HeLa	Línea de células epiteliales humanas adherentes, provenientes de un adenocarcinoma cervical	American Type Culture Collection (ATCC)

### 5.4. Plasmidios

Los diferentes plasmidios utilizados en esta tesis se presentan en la **Tabla 3**.

**Tabla 3. Plasmidios utilizados en esta tesis.**

Plasmidio	Descripción	Origen
pCLF4	<i>bla</i> FRT <i>aph</i> FRT P1 P2 oriR6K, promotor T7, Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> (GenBank EU629214)	Santiviago et al., 2009
pKD46	<i>bla</i> P <sub>BAD</sub> <i>gam</i> <i>bet</i> <i>exo</i> oriRpSC101(TS), Amp <sup>R</sup> (GenBank AY048746)	Datsenko & Wanner, 2000
pCP20	<i>bla</i> <i>cat</i> <i>cl857</i> <i>IPR</i> <i>flp</i> pSC101 <i>ori</i> TS, Amp <sup>R</sup> , Cam <sup>R</sup>	Datsenko & Wanner, 2000
pFCcGi	Vector que contiene clonado el gen EGFP bajo el control del promotor P <sub>BAD</sub> (inducible) y el gen mCherry bajo el control del promotor de <i>rpsM</i> (constitutivo), Amp <sup>R</sup>	Figueira et al., 2013
pGEM-T Easy	Vector comercial de clonamiento, Amp <sup>R</sup>	Promega
pMMB207-CyaA'	Vector pMMB207 que posee clonado un fragmento de DNA que codifica el dominio adenilato ciclasa del gen <i>cyaA</i> de <i>B. pertussis</i> bajo el control del promotor <i>lac</i> , Cam <sup>R</sup>	Stock de laboratorio
pSipA	Vector pMMB207-CyaA' que posee clonado el gen silvestre <i>sipA</i> de <i>S. Typhimurium</i> 14028s generando una fusión traduccional con <i>cyaA</i> ', Cam <sup>R</sup>	Este trabajo
pSseF	Vector pMMB207-CyaA' que posee clonado el gen silvestre <i>sseF</i> de <i>S. Typhimurium</i> 14028s generando una fusión traduccional con <i>cyaA</i> ', Cam <sup>R</sup>	Este trabajo
pSseG	Vector pMMB207-CyaA' que posee clonado el gen silvestre <i>sseG</i> de <i>S. Typhimurium</i> 14028s generando una fusión traduccional con <i>cyaA</i> ', Cam <sup>R</sup>	Este trabajo
pSseK1	Vector pIZ1673 que posee clonado el gen silvestre <i>sseK1</i> de <i>S. Typhimurium</i> 14028s generando una fusión traduccional con <i>cyaA</i> ', Amp <sup>R</sup>	Baisón-Olmo et al., 2015
pCyaA'-Kan	Plasmidio que contiene la región codificante del dominio adenilato ciclasa del gen <i>cyaA</i> de <i>B. pertussis</i> rio arriba de un cassette de resistencia a Kan flanqueado por sitios FRT	Fernández et al., 2021

## 5.5. Partidores

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

**Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en esta tesis.**

Nombre	Secuencia 5' – 3'
sipA_H1+P1	GATATTAATAATGGTTACAAGTGTAAAGGACTCAGCCCCCGTGCAGGCTGGAGCTGCTTC
sipA_H2+P2	TCCCGGTTAATTAACGCTGCATGTGCAAGCCATCAACGGTCATATGAATATCCTCCTTAG
sipA_Out5	CAGACGCTGACGCAAAAATA
sipA_Out3	GATCCTCAACCAGATGGGTC
sseF_H1+P1	AGAACGAAATATGAAAATTCATATTCCGTCAGCGGCAAGTGTGCAGGCTGGAGCTGCTTC
sseF_H2+P2	CTAACAGGTTTCATGGTTCTCCCCGAGATGTATGATCAGACATATGAATATCCTCCTTAG
sseF_Out5	CACGACGGCCATTAATTTCT
sseF_Out3	CGCTCTTTTCTTGTTGAGG
sseG_H1+P1	GGGGAGAACCATGAAACCTGTTAGCCAAATGCTCAGGTAGTGCAGGCTGGAGCTGCTTC
sseG_H2+P2	CTGAAAACGATTACTCCGGCGCACGTTGTTCTGGCGTTACCATATGAATATCCTCCTTAG
sseG_Out5	TGATAGCGTTGCTCTTGTTGG
sseG_Out3	GCCATGTGGGAGAGCATATC
sipA_CyaA_5'	GCTCTAGAAACAGAAGAGGATTAATAATGGTTACAAGTGTAAAGGAC
sipA_CyaA_3'	CCGCTCGAGACGCTGCATGTGCAAGCCATCAACGGTAGTAATAACCCGA
sseF_CyaA_5'	GCTCTAGAAACAGAACGAAATATGAAAATTCATATTCCGTCAGCGGC
sseF_CyaA_3'	CCGCTCGAGTGGTTCTCCCCGAGATGTATGATCAGAACTGTCCATTAAT
sseG_CyaA_5'	GCTCTAGACATACATCTCGGGGAGAACCATGAAACCTGTTAGCCAAA
sseG_CyaA_3'	CCGCTCGAGCTCCGGCGCACGTTGTTCTGGCGTTACCTGAGCCAGCAAA
sipA_H1+C1	TCGGGTTATTACTACCGTTGATGGCTTGACATGCAGCGTCTGCAGCAATCGCATCAGGC
sipA_H2+C2	CTTCAATATCCATATTCATCGCATCTTCCCCGGTTAATTAATCATATGAATATCCTCCTTAG
sseF_H1+C1	ATTAATGGACAGTTCTGATCATACTCTCGGGGAGAACCACTGCAGCAATCGCATCAGGC
sseF_H2+C2	GACGTTGCCCTCCTACCTGAGCATTTGGGCTAACAGGTTTCATATGAATATCCTCCTTAG
sseG_H1+C1	TTTGCTGGCTCAGGTAACGCCAGAACAACGTGCGCCGAGCTGCAGCAATCGCATCAGGC
sseG_H2+C2	AGAAAGCAATGAACATCCGGTATATACCTGAAAACGATTACATATGAATATCCTCCTTAG
CyaRev	CCTTGATGCCATCGAGTACG
cyaA(F)-BamHI	CAGGATCCTGCAGCAATCGCATCAGGC
pCLF4(R)-BamHI-XhoI	ACACTCGAGGATCCATATGAATATCCTCCTTAG
SP6	ATTTAGGTGACACTATAGAA
T7	TAATACGACTCACTATAGGG

Los fragmentos destacados en rojo en la secuencia de los partidores H1+P1 y H2+P2 hibridan con las regiones P1 y P2 del plasmidio pCLF4 (Santiviago et al., 2009). Los fragmentos destacados en rojo en la secuencia de los partidores H1+C1 y H2+C2 hibridan con las regiones C1 y C2 del plasmidio pCyaA'-Kan (Fernández et al., 2021).

## 5.6. Condiciones de cultivo bacteriano

Las bacterias se cultivaron en caldo Luria-Bertani (LB; 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl) a 37°C con agitación. Cuando se requirió, el medio se suplementó con ampicilina (Amp; 100 mg/L), cloranfenicol (Cam; 20 mg/L), kanamicina (Kan; 50 mg/L), o estreptomycin (Str; 300 mg/L). Para solidificar el medio de cultivo, se suplementó con Bacto-Agar (15 g/L).

En el caso de los ensayos de infección para determinar supervivencia intracelular en *D. discoideum*, los inóculos bacterianos se prepararon en caldo LB (suplementando con Kan si la cepa a analizar presentaba resistencia a este antibiótico) y se incubaron O.N. con agitación a 37°C.

En el caso de los ensayos de infección para determinar translocación de efectores, se crecieron las bacterias en medios que inducen la expresión de los genes de SPI-1 o SPI-2. La cepa *sipA-cyaA'* fue crecida en LB conteniendo 300 mM NaCl, condición inductora de la SPI-1 (Mizusaki et al., 2008), mientras que las cepas *sseF-cyaA'* y *sseG-cyaA'* fueron crecidas en medio mínimo N modificado (5 mM KCl, 7,5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 mM Tris-HCl pH 5,5, 38 mM glicerol, 0,1% casaminoácidos) suplementado con 10 µM de MgCl<sub>2</sub>, condición inductora de la SPI-2 (Nelson & Kennedy, 1971). Ninguno de estos cultivos fue suplementado con antibióticos.

En el caso de los ensayos de infección para el monitoreo del compartimiento vacuolar, las bacterias se incubaron O.N. en LB suplementado con Amp, a 37°C con agitación.

## 5.7. Cepas de *Dictyostelium discoideum* y condiciones de cultivo

Las cepas de *D. discoideum* utilizadas correspondieron a las cepas axénicas AX4 y AX2 VatM-GFP (**Tabla 2**). Se mantuvieron a 22°C creciendo sobre un césped de *Klebsiella aerogenes* DBS0305928 desarrollado en medio SM sólido (10 g/L glucosa, 10 g/L peptona, 1 g/L extracto de levadura, 1 g/L extracto de levadura, 1 g/L MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 1,9 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,6 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 g/L agar-agar).

Previo a los ensayos de infección, el cultivo de *D. discoideum* AX4 fue transferido a medio de cultivo HL5 líquido (14 g/L triptona, 7 g/L extracto de levadura, 0,35 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,2 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 14 g/L glucosa, pH 6,3) suplementado con Str (300 mg/L) y Amp (100 mg/L). A partir del primer subcultivo, el medio se suplementó sólo con Amp. Las amebas se crecieron con agitación y en condiciones axénicas (libres de bacterias) a 22°C por al menos 3

subcultivos consecutivos. Para realizar los subcultivos, las amebas fueron colectadas en su fase exponencial temprana ( $1 - 2 \times 10^6$  células/mL). Para los ensayos de infección siempre se usaron amebas provenientes del 3° al 6° subcultivo.

En el caso de la cepa AX2 VatM-GFP, previo a los ensayos de infección el cultivo fue transferido a medio HL5 líquido suplementado con Str y Amp. A partir del primer subcultivo, el medio se suplementó con Amp y G418 (20 mg/L). El resto de las condiciones de cultivo fueron iguales a las utilizadas para crecer la cepa AX4.

### **5.8. Extracción de plasmidios**

Para la extracción de plasmidios se utilizó el sistema comercial *QIAprep Spin Miniprep Kit* de QIAGEN, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se sedimentó 5 mL de un cultivo O.N. de la bacteria que contenía el plasmidio de interés. El sedimento se resuspendió en 250  $\mu$ L de tampón P1 suplementado con LyseBlue y se trasladó a un tubo de microcentrífuga. Luego, se le añadió 250  $\mu$ L de tampón P2 a cada tubo y se mezcló por inversión hasta que la solución adquirió una coloración azul homogénea. Rápidamente, se añadió 350  $\mu$ L de tampón N3 a cada tubo y se mezcló por inversión vigorosamente hasta que la solución perdiera el color. Se centrifugó cada tubo a 17900 x *g* por 10 min, se tomó 800  $\mu$ L del sobrenadante y se transfirió a una columna *QIAprep 2.0 spin column*. Cada columna se centrifugó por 1 min a 17900 x *g*. Se desechó el volumen filtrado y las columnas se lavaron con 750  $\mu$ L de tampón PE. Se centrifugó por 1 min a 17900 x *g* y el filtrado se desechó. Este paso se repitió una vez más. Luego, se trasladó cada columna a un tubo de microcentrífuga y se agregó 50  $\mu$ L de agua libre de nucleasas en el centro de la columna. Se dejó reposar por 5 min y finalmente se centrifugó por 1 min a 17900 x *g* para obtener una solución que contenía el plasmidio purificado. Finalmente, se analizó el DNA plasmidial mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE.

### **5.9. Purificación de fragmentos de DNA**

Para la purificación de productos de PCR, se utilizó el sistema comercial *QIAquick PCR Purification Kit* siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se trasladó el volumen de una reacción de PCR a un tubo de microcentrífuga y se agregó 5 volúmenes de tampón PB. La muestra se transfirió a una columna *QIAquick spin column* y se centrifugó por 1 min a 17900 x *g*. Se descartó el volumen filtrado y se agregó 750  $\mu$ L de tampón PE. Se centrifugó por 1 min a 17900 x *g*, se descartó el volumen filtrado y se repitió la centrifugación. Posteriormente, se trasladó la columna a un tubo de microcentrífuga y se

agregó 30  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas al centro de cada una. Se dejó reposar por 5 min y finalmente se centrifugó a 17900 x  $g$  por 1 min, para obtener el producto de PCR purificado. Finalmente, se analizó el DNA mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE.

Para la purificación de plasmidios previamente digeridos con enzimas de restricción para usarlos en clonamientos, se utilizó el sistema comercial *QIAquick Gel Extraction Kit* siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, posterior a una electroforesis en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE, se cortó un trozo de agarosa que contenía el plasmidio a purificar. Se determinó la masa del gel cortado, se transfirió a un tubo de centrifuga Falcon de 15 mL y se agregó 3  $\mu\text{L}$  de tampón QG por cada milígramo de gel. Se incubó a 50°C en un baño termostático hasta que el trozo de gel se fundió completamente. Luego, se agregó 1 volumen de isopropanol al tubo y se mezcló por inversión. Se trasladó cada muestra a una columna *QIAquick spin column* y se centrifugó por 1 min a 17900 x  $g$ . Se descartó el filtrado y se agregó 750  $\mu\text{L}$  de tampón PE a cada columna. Se incubó por 2 min y se centrifugó por 1 min a 17900 x  $g$ . Se descartó el filtrado y se repitió la centrifugación. Finalmente, se trasladó la columna a un tubo de microcentrifuga, se agregó 30  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas al centro de las columnas, se dejó reposar por 5 min y se centrifugó por 1 min a 17900 x  $g$ , obteniéndose una solución que contenía el fragmento de plasmidio purificado. Finalmente, el fragmento purificado se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE.

Para la obtención de productos de PCR purificados para usarse en clonamientos, se utilizó el sistema comercial *QIAquick Gel Extraction Kit* siguiendo el mismo protocolo detallado en el párrafo anterior. Luego de la extracción, se analizó el DNA purificado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE.

#### **5.10. Electroforesis en gel de agarosa**

El análisis de muestras de DNA se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % en tampón TAE (Tris-acetato-EDTA, pH 8,3), teñidos con GelRed 1X. Las muestras se resolvieron a 100V por 30 min y se visualizaron en un transiluminador UV usando un sistema de captura de imágenes microDOC (Clever Scientific Ltd).

## 5.11. Construcción de mutantes de *S. Typhimurium*

### 5.11.1. Preparación de células bacterianas electrocompetentes y transformación bacteriana

A partir de un inóculo bacteriano crecido O.N. se preparó un cultivo 1:100 en caldo LB, el cual se mantuvo a 37°C con agitación hasta alcanzar una OD<sub>600nm</sub> de 0,4-0,6. Posteriormente, se sedimentó 1 mL del cultivo mediante centrifugación a 13000 rpm por 1 min a temperatura ambiente y el sedimento se lavó 6 veces con 1 mL de agua destilada estéril. Finalmente, el sedimento bacteriano se suspendió en 80 µL de agua destilada estéril y se transformó mediante electroporación siguiendo los protocolos que se detallan más adelante. Alternativamente, a partir de un inóculo bacteriano crecido O.N. se preparó un cultivo 1:10 en 20 mL en caldo LB, el cual se incubó a 37°C con agitación hasta alcanzar una OD<sub>600nm</sub> de 0,4-0,6. Luego, el cultivo se sedimentó mediante centrifugación a 6000 rpm por 10 min a 4°C y el sedimento se lavó 3 veces con glicerol al 15% estéril y frío. Cuando se completaron los lavados, el sedimento se suspendió en 1 mL de glicerol al 15% estéril y frío y se separó en alícuotas de 80 µL, las que se usaron inmediatamente para transformaciones mediante electroporación.

Para las transformaciones bacterianas, se mezcló 80 µL de bacterias electrocompetentes con 5 µL de plasmidio o 15 µL de un producto de PCR en un tubo de microcentrífuga estéril y se dejó reposar por 2 min en hielo. Posteriormente, se trasladó el volumen a una cubeta de electroporación fría de 1 mm y se electroporó usando 1,8 kV en el equipo *E. coli Pulser*<sup>TM</sup> de Bio-Rad. Luego, se agregó 1 mL de caldo LB a la cubeta, se transfirió la suspensión bacteriana a un tubo *Snap Cap* de 15 mL y se incubaron las bacterias a 37°C con agitación por 1 h. Posteriormente, se sedimentó la suspensión bacteriana y se resuspendió en 200 µL de caldo LB. Finalmente, se sembró en agar LB suplementado con el antibiótico correspondiente y se incubó un mínimo de 16 h a 30°C ó 37°C, según correspondiera.

### 5.11.2. Preparación de células bacterianas para mutagénesis por reemplazo alélico

A partir de un cultivo O.N. de *S. Typhimurium* 14028s transformada previamente con el plasmidio pKD46 siguiendo el procedimiento descrito en la **Sección 5.11.1**, se preparó un cultivo 1:10 en caldo LB suplementado con Amp y se incubó con agitación a 30°C hasta alcanzar una OD<sub>600nm</sub> de 0,3-0,5. Luego, se suplementó el cultivo con L-arabinosa estéril

hasta obtener una concentración de 10 mM y se continuó con la incubación en las mismas condiciones hasta alcanzar una OD<sub>600nm</sub> de 0.6. Posteriormente, se prepararon bacterias competentes siguiendo el procedimiento descrito en la **Sección 5.11.1**.

### 5.11.3. Mutagénesis por intercambio alélico

Las cepas  $\Delta sipA$ ,  $\Delta sseF$ ,  $\Delta sseG$ ,  $\Delta sseFG$ , derivadas de *S. Typhimurium* 14028s fueron construidas siguiendo el método de recombinación “Red-swap” con modificaciones, utilizando pCLF4 como molde para las amplificaciones por PCR (Santiviago et al., 2009). Los partidores para realizar las amplificaciones por PCR (partidores H1+P1 y H2+P2 descritos en la **Tabla 4**) se diseñaron basándose en la secuencia genómica de la cepa silvestre (Jarvik et al., 2010) y la reacción de amplificación se llevó a cabo siguiendo el programa presentado en la **Tabla 5**, usando la mezcla de reactivos detallado en la **Tabla 6**.

**Tabla 5. Programa de amplificación para PCR usando partidores H1+P1 y H2+P2.**

Temperatura (°C)	Tiempo (min:seg)	Ciclos
94	2:00	1
94	0:30	30
55	0:30	
72	1:45	
72	5:00	1
4	∞	-

**Tabla 6. Mezcla de reacción para PCR usando partidores H1+P1 y H2+P2.**

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración
Solución amortiguadora 10X	5	1X
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5	1,5 mM
dNTPs 50X (10 mM c/u)	1	0,2 mM
Partidor 1 (10 μM)	1	0,2 μM
Partidor 2 (10 μM)	1	0,2 μM
<i>Taq</i> DNA Polimerasa (5 U/μL)	0,3	0,03 U/μL
DNA (pCLF4)	0,5	-
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	39,7	-

Posteriormente, los productos de PCR obtenidos se transformaron en la cepa 14028s/pKD46 electrocompetente, como se describe en la **Sección 5.11.1** y las transformantes se seleccionaron en placas de agar LB suplementadas con Kan. El intercambio alélico se confirmó mediante PCR utilizando partidores flanqueando los extremos 5' y 3' del marco de lectura abierto (ORF) a eliminar (partidores Out3 y Out5

descritos en la **Tabla 4**), siguiendo el programa de amplificación presentado en la **Tabla 7** y la mezcla de reacción presentada en la **Tabla 8**. Las reacciones de PCR se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% en solución tampón TAE. Finalmente, cada alelo mutante se transfirió a la cepa silvestre mediante transducción generalizada con el fago P22.

**Tabla 7. Programa de amplificación para PCR de colonias usando partidores Out3 y Out5.**

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

**Tabla 8. Mezcla de reacción para PCR de colonias usando partidores Out3 y Out5.**

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

#### 5.11.4. Transducción generalizada con fago P22

Para eliminar cualquier mutación secundaria que pudo haberse generado durante el proceso de mutagénesis por reemplazo alélico, cada alelo mutante se transfirió desde el cromosoma de las cepas construidas al genoma de la cepa silvestre mediante transducción generalizada usando el fago P22 HT105/1 *int-201* (Maloy, 1990).

Para la preparación de las partículas transductantes, se mezcló 1 mL de caldo de fago P22 HT105/1 *int-201* con 200 µL de un cultivo de la cepa mutante dadora y se incubó por 16 h a 37°C con agitación. Luego, se centrifugó cada mezcla a 12000 rpm por 2 min para sedimentar las bacterias no infectadas y los restos celulares. Se recuperó el sobrenadante y se esterilizó agregando 200 µL de CHCl<sub>3</sub>, mezclando fuertemente y centrifugando a 12000 rpm por 1 min para separar las fases. Se recuperó la fase superior y se repitió la

esterilización 2 veces. Cada lisado conteniendo las partículas transducentes obtenidas a partir de una cepa dadora en particular se almacenó a 4°C hasta el momento de su uso.

Para la transducción, se mezcló 20 µL de un lisado obtenido de la cepa dadora con 200 µL de un cultivo de *S. Typhimurium* 14028s crecida O.N. y se incubó la mezcla a 37°C por 30 min para permitir la adsorción de las partículas del fago. Posteriormente, se centrifugó a 13000 rpm por 2 min para sedimentar las bacterias infectadas. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 200 µL de medio LB estéril. Luego, se sembró en placas de agar LB suplementadas con Kan, las cuales se incubaron por toda la noche a 37°C para poder seleccionar las colonias transducentes. Las colonias seleccionadas se sembraron en placas de agar EBU suplementadas con Kan, realizando aislamiento sucesivos hasta obtener colonias blancas, las que sólo contenían bacterias libres de partículas fágicas.

Para comprobar la ausencia del fago P22 HT105/1 *int-201* en las bacterias transducidas, se realizó un ensayo de sensibilidad al fago P22 H5. Se sembró 30 µL de fago P22 H5 en placas de LB, dejando deslizar el volumen en la placa para formar una línea. Luego, se sembró cada colonia blanca de forma tal que intersectara la línea de fago. Cada placa se incubó a 37°C y se identificaron las transducentes libres del fago P22 HT105/1 *int-201*, que correspondían a aquellas que presentaron un crecimiento interrumpido en presencia del fago P22 H5. Finalmente, se verificó la presencia de la mutación esperada en cada cepa mediante PCR de colonias, siguiendo el programa de amplificación presentado en la **Tabla 7** y la mezcla de reacción presentada en la **Tabla 8**.

## **5.12. Fusiones génicas a reporteros**

Para determinar la producción y secreción de los efectores en estudio, se generaron cepas que expresaban fusiones plasmidiales y cromosomales de estos efectores al reportero CyaA'. Este último corresponde al dominio catalítico de la proteína CyaA de *Bordetella pertussis* que presenta actividad adenilato ciclasa dependiente de calmodulina, por lo que sólo es activa en el citoplasma de una célula eucarionte (Miao et al., 2000). Además, esta proteína puede ser detectada mediante *Western blot* usando anticuerpos adecuados.

### **5.12.1. Fusiones plasmidiales a CyaA'**

Las fusiones plasmidiales a CyaA' se generaron mediante PCR, amplificando el ORF del gen de interés utilizando partidores que poseen sitios de corte para las enzimas de restricción *XbaI* y *XhoI* (partidores CyaA descritos en la **Tabla 4**), siguiendo el programa de

amplificación presentado en la **Tabla 9** y la mezcla de reacción presentada en la **Tabla 10**. Posteriormente, cada producto de PCR se purificó con el sistema comercial *QIAquick PCR Purification Kit* (**sección 5.9**) y fue ligado al vector pGEM-T Easy usando la mezcla de reacción que se presenta en **Tabla 11**.

**Tabla 9. Programa de amplificación para PCR usando partidores CyaA'.**

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

**Tabla 10. Mezcla de reacción para PCR de colonias usando partidores CyaA'.**

Reactivo	Volumen (µL)	Concentración
Solución amortiguadora 5X	4	1X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,6	2 mM
dNTPs 50X (10 mM c/u)	0,4	0,2 mM
Partidor 1 (10 µM)	0,4	0,2 µM
Partidor 2 (10 µM)	0,4	0,2 µM
<i>GoTaq</i> DNA Polimerasa (5 U/µL)	0,2	0,05 U/µL
DNA (suspensión bacteriana)	2	-
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	11	-

**Tabla 11. Mezcla de reacción para ligación en pGEM-T Easy.**

Reactivo	Volumen (µL)	Concentración
Solución amortiguadora 10X	3	1X
Vector pGEM-T Easy	1	-
Producto de PCR purificado	7	-
T4 DNA Ligasa (3 U/µL)	1	0,1 U/µL
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	18	-

La mezcla de ligación se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Luego, se dializó contra agua por 30 min antes de usarla para transformar. La ligación se confirmó mediante PCR usando los partidores SP6 y T7 según las **Tablas 9** y **10**. Posteriormente, se transformó *E. coli* DH5α según lo descrito en la **Sección 5.11.1**, se seleccionaron las transformantes a 37°C en agar LB suplementado con Amp y se purificó cada plasmidio recombinante obtenido (i.e., pGEM-T::*sipA*, pGEM-T::*sseF* y pGEM-T::*sseG*) según lo

descrito en la **Sección 5.8**. Luego, estos plasmidios recombinantes y el vector pMMB207-CyaA' fueron digeridos con las enzimas *Xba*I y *Xho*I usando la mezcla de reacción presentada en la **Tabla 12**.

**Tabla 12. Mezcla de reacción para digestión de pMMB207-CyaA' y derivados de pGEM-T Easy.**

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración
DNA	32	-
Solución amortiguadora D 10X	4	1X
<i>Xho</i> I (100 U/μL)	2	5 U/μL
<i>Xba</i> I (20 U/μL)	2	1 U/μL

La reacción se llevó a cabo durante toda la noche a 37°C. Las digestiones se confirmaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE.

Posteriormente, se purificó el inserto obtenido a partir de las digestiones de los plasmidios pGEM-T::*sipA*, pGEM-T::*sseF* y pGEM-T::*sseG* a partir de un gel de agarosa según lo descrito en la **Sección 5.9**. Posteriormente, cada inserto se ligó en el plasmidio pMMB207-CyaA' previamente digerido con las mismas enzimas y purificado a partir de geles de agarosa (**Sección 5.9**), usando la mezcla de reacción presentada en la **Tabla 13**.

**Tabla 13. Mezcla de reacción para ligación en pMMB207-CyaA'.**

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración
Solución amortiguadora ligasa 10X	3	1X
Plasmidio pMMB207-CyaA'	15,5	-
Inserto	10	-
T4 DNA Ligasa (3 U/μL)	1,5	0,15 U/μL

La reacción de ligación se llevó a cabo a 23°C durante toda la noche. Luego, el producto de ligación se transformó en *E. coli* DH5α electrocompetente según lo descrito en la **Sección 5.11.1** y se seleccionaron las transformantes a 37°C en agar LB suplementado con Cam. La estructura de los plasmidios recombinantes se confirmó mediante PCR (**Tablas 9 y 10**) y digestión con las enzimas *Xba*I y *Xho*I (**Tabla 12**). Finalmente, los plasmidios recombinantes se purificaron desde *E. coli* DH5α y se transformaron mediante electroporación en distintas cepas de *S. Typhimurium* según lo descrito en la **Sección 5.11.1** para evaluar producción y secreción de los efectores.

### 5.12.2. Fusiones cromosomales a CyaA'

Las fusiones cromosomales de los efectores SipA, SseF y SseG a CyaA' se construyeron mediante el método de recombinación "Red swap" con modificaciones (Fernández et al., 2021). Se utilizó el vector pCyaA'-Kan como molde y los partidores H1+C1 y H2+C2 (**Tabla 4**) para obtener productos de PCR que contienen el ORF del dominio catalítico de la proteína CyaA de *B. pertussis* junto con un *cassette* de resistencia a Kan, todo esto flanqueado por regiones de homología inmediatamente río arriba y río abajo del codón de término de la traducción del ORF que codifica el efector correspondiente. El programa de amplificación y la mezcla de reacción utilizados se detallan en las **Tablas 14 y 15**.

**Tabla 14. Programa de amplificación para PCR usando partidores H1+C1 y H2+C2.**

Temperatura (°C)	Tiempo (min:seg)	Ciclos
98	3:00	1
98	0:30	35
53	0:30	
72	1:30	
72	10:00	1
4	∞	-

**Tabla 15. Mezcla de reacción para PCR usando partidores H1+C1 y H2+C2.**

Reactivo	Volumen (µL)	Concentración
Solución amortiguadora HF 5X	10	1X
dNTPs 50X (10 mM c/u)	1	0,2 mM
Partidor 1 (10 µM)	2,5	0,5 µM
Partidor 2 (10 µM)	2,5	0,5 µM
<i>Phusion</i> DNA Polimerasa (2 U/µL)	0,5	0,02 U/µl
DNA (pCyaA'-Kan)	1	-
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	32,5	-

Posteriormente, cada producto de PCR se purificó a partir de un gel de agarosa (**Sección 5.9**) y se transformó en la cepa 14028s/pKD46 electrocompetente (**Sección 5.11.1**). Se sembró la cepa electroporada en placas de LB suplementado con Kan y se incubó a 37°C para seleccionar las colonias transformantes. La fusión se comprobó mediante PCR con un partidor Out5' específico para cada efector y el partidor CyaRev que hibrida dentro del ORF *cyaA'* (**Tabla 4**), siguiendo el programa de amplificación y la mezcla de reacción detallados en las **Tablas 7 y 8**.

Para eliminar el *cassette* de resistencia a Kan de las fusiones cromosomales, se transformó cada cepa mutante con el plasmidio termosensible pCP20 que codifica la recombinasa FLP y que confiere resistencia a Amp (Datsenko & Wanner, 2000; Cherepanov & Wackernagel, 1995). Las transformantes se seleccionaron a 30°C en placas de agar LB suplementadas con Amp. Las colonias que presentaron resistencia a Amp se volvieron a sembrar en placas de agar LB, agar LB suplementado con Kan y agar LB suplementado con Amp, pero esta vez se crecieron a 37°C. Se seleccionaron las colonias que perdieron la resistencia ambos antibióticos, se replicaron en placas de agar LB y se comprobó mediante PCR la pérdida del *cassette* de Kan, utilizando los partidores *cyaA*(F)-BamHI y pCLF4(R)-BamHI-XhoI (**Tabla 4**), usando el programa de amplificación y la mezcla de reacción detallados en las **Tablas 7 y 8**.

### **5.13. Ensayos de infección para determinar supervivencia intracelular en *D. discoideum***

Previo a la infección, las bacterias se cultivaron a 37°C por toda la noche en medio LB (**Sección 5.6**) y cada cultivo se lavó 3 veces con tampón Soerensen (0,36 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 2 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,0). El sedimento bacteriano se resuspendió en 1 mL del mismo tampón. Paralelamente, un cultivo axénico de *D. discoideum* AX4 se centrifugó a 200 x *g* a 23°C y se lavó 2 veces con tampón Soerensen. El sedimento de amebas se resuspendió en 10 mL del mismo tampón.

Para la infección, ~2 x 10<sup>6</sup> amebas se coincubaron con la cepa bacteriana correspondiente (ensayo de infección simple), o con una mezcla 1:1 entre la cepa silvestre y una mutante a evaluar (ensayo de infección por competencia), durante 1 h a 22°C con agitación en 10 mL de tampón Soerensen, usando una multiplicidad de infección (MOI) de 100 bacterias/ameba para ambos tipos de ensayo. Posteriormente, cada cocultivo se centrifugó a 500 x *g* durante 5 min y el sedimento se lavó 3 veces con tampón Soerensen para remover las bacterias no internalizadas (t=0 h). El sedimento se resuspendió en 10 mL de tampón Soerensen y se dejó incubando a 23°C con agitación. Posteriormente, alícuotas de 100 µL obtenidas a distintos tiempos post infección (1, 3 y 6 h) se lavaron con tampón Soerensen suplementado con gentamicina (10 mg/L) para eliminar bacterias extracelulares y a continuación se eliminó el antibiótico mediante un lavado con tampón Soerensen. Finalmente, se lisaron las amebas con tampón Soerensen suplementado con Triton X-100 (0,2%). La cantidad de bacterias intracelulares se determinó sembrando diluciones seriadas de los lisados en

placas de agar LB o agar LB suplementado con Kan, según correspondiera (**Figura 5**). El número de amebas viables se determinó utilizando el método de exclusión de azul de tripán y contando en una cámara de Neubauer. La internalización y supervivencia intracelular para los resultados de los ensayos de infección simple se calcularon mediante las siguientes fórmulas:

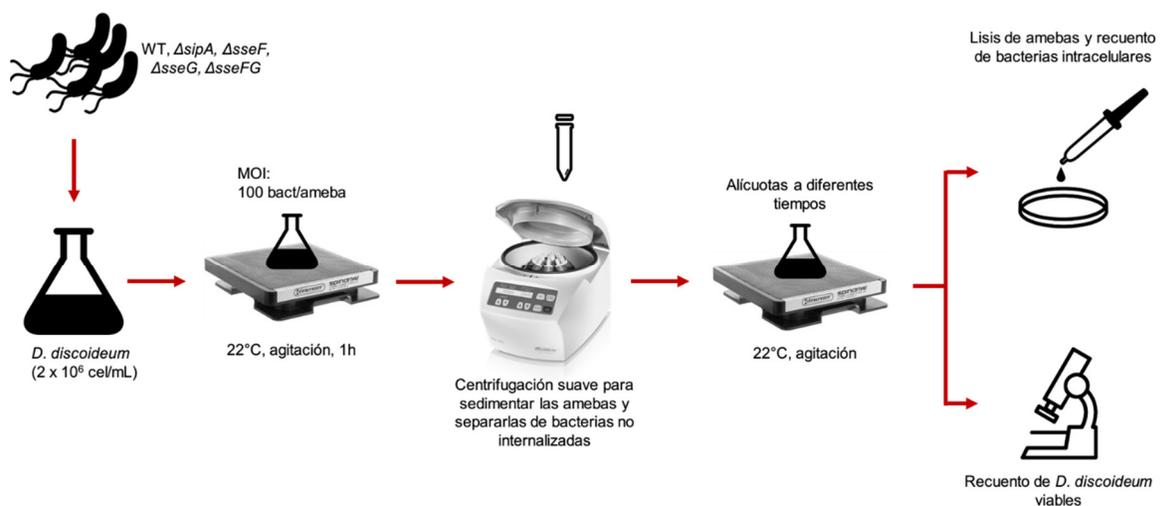
$$\% \text{ de internalización} = \frac{\left(\frac{UFC}{\text{ameba}}\right)_{t=0}}{\left(\frac{UFC}{\text{amebas}}\right)_{\text{inóculo}}} \times 100$$

$$\% \text{ de supervivencia} = \frac{\left(\frac{UFC}{\text{ameba}}\right)_{t=x}}{\left(\frac{UFC}{\text{amebas}}\right)_{t=0}} \times 100$$

Por otra parte, los resultados de los ensayos por competencia fueron calculados mediante las siguientes fórmulas, y expresados como  $\log_{10}$ .

$$\text{Internalización relativa} = \frac{\left(\frac{UFC_{\text{mutante}}}{UFC_{WT}}\right)_{t=0}}{\left(\frac{UFC_{\text{mutante}}}{UFC_{WT}}\right)_{t=\text{inóculo}}}$$

$$\text{Supervivencia relativa} = \text{Índice de Competencia} = \frac{\left(\frac{UFC_{\text{mutante}}}{UFC_{WT}}\right)_{t=x}}{\left(\frac{UFC_{\text{mutante}}}{UFC_{WT}}\right)_{t=0}}$$



**Figura 5.** Ensayo de internalización y supervivencia intracelular de cepas de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*.

#### **5.14. Producción y secreción de fusiones a CyaA' *in vitro***

La producción de las de las proteínas de fusión de los efectores a CyaA' fue evaluada mediante *Western blot*. Para esto, las cepas que expresaban fusiones cromosomales a CyaA' se cultivaron en condiciones inductoras de la SPI-1 (crecimiento estático en medio LB conteniendo 300 mM de NaCl) y de la SPI-2 (crecimiento en medio mínimo N suplementado con 10  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>) hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 0,4. En el caso de las cepas que expresaban fusiones plasmidiales a CyaA', las bacterias fueron cultivadas a 37°C en LB hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 0,4. Luego, el medio fue suplementado con IPTG hasta alcanzar una concentración de 10 o 100  $\mu$ M para inducir la expresión de las fusiones y se continuó con la incubación por 2 h.

Para obtener lisados bacterianos, 1 mL de cada cultivo se sedimentó por centrifugación a 15000 x g por 2 min a 23°C y el sedimentó se resuspendió en tampón PBS y se ajustó a una OD<sub>600</sub> de 2. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 75  $\mu$ L de cada suspensión, las que se mezclaron con 25  $\mu$ L de tampón de muestra de Laemmli 4x (Bio-Rad) y se hirvieron en un baño de agua por 5 min para su posterior análisis.

Para obtener las proteínas secretadas, el sobrenadante del cultivo fue filtrado usando un filtro con un diámetro de poro de 0,22  $\mu$ m para remover bacterias y restos bacterianos. Luego, las proteínas en el filtrado fueron precipitadas con un 20% (v/v) de ácido tricloroacético (TCA) a 4°C por 16 h. Las proteínas precipitadas se recolectaron mediante centrifugación a 15000 x g durante 15 min. El precipitado obtenido fue lavado 3 veces con acetona fría, resuspendido en 100  $\mu$ L de tampón de muestra de Laemmli 1x y luego hervido en un baño de agua por 5 min para su posterior análisis.

#### **5.15. SDS-PAGE y *Western blot***

Las proteínas presentes en cada muestra fueron resueltas mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12 % usando tampón de corrida 1X (1,44% glicina, 0,3% Tris, 0,1% SDS). La electroforesis se realizó a 60 V constantes hasta que el frente de migración alcanzara el gel resolutivo y luego a 120 V constantes hasta que el frente de migración alcanzó el fondo del gel. Luego, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (previamente activadas con metanol) aplicando 300 mA por 90 min a temperatura ambiente, usando tampón de transferencia 1X (1,44% glicina, 0,3% Tris, 20% metanol). Una vez completada la transferencia de las proteínas, la membrana se lavó 3 veces con tampón TBS (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl) suplementado con 0,1% Tween-20 (TBS-T) por 5

min. Se bloqueó la membrana con solución de bloqueo Bio-Rad por 1 h, se lavó nuevamente 3 veces con TBS-T por 5 min y se incubó durante toda la noche con el anticuerpo primario anti-CyaA (3D1) (ratón, Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:5000 en solución de bloqueo. Al día siguiente, la membrana se lavó 3 veces con TBS-T por 15 min y posteriormente se incubó por 2 h con el anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado con peroxidasa de rabanito (caballo, Cell Signaling Technologies), diluido 1:10000 en solución de bloqueo. Se lavó 3 veces con TBS-T y las bandas de proteínas fueron reveladas utilizando el sustrato quimioluminiscente *SuperSignal West Femto* (Thermo Fisher Scientific), según instrucciones del fabricante. Las imágenes correspondientes se capturaron con el sistema Dyversity 4 (Syngene) equipado con el software GeneSys 1.2.5.0 (Syngene).

## **5.16. Ensayos de infección para determinar translocación de efectores**

### **5.16.1. Ensayos de infección para determinar translocación de efectores en células HeLa**

Se sembraron  $2 \times 10^5$  células HeLa por pocillo en placas de 24 pocillos que contenían DMEM suplementado con 10% (v/v) de FBS (DMEM-FBS) y se incubaron a 37°C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub> hasta formar una monocapa confluyente. Antes de infectar, las células se lavaron 3 veces con PBS estéril. Por otra parte, las bacterias se crecieron O.N. en condiciones inductoras de la SPI-1 (i.e., las cepas que expresan la fusión cromosomal SipA-CyaA' y las fusiones plasmidiales SipA-CyaA' y SseK-CyaA') o de la SPI-2 (i.e., las cepas que expresan las fusiones cromosomales SseF-CyaA' y SseG-CyaA' y las fusiones plasmidiales SseF-CyaA' y SseG-CyaA'). Adicionalmente, los cultivos de las cepas que expresan las fusiones plasmidiales SipA-CyaA', SseF-CyaA' y SseG-CyaA' se suplementaron con IPTG 10 µM durante toda la noche. Las bacterias se lavaron 3 veces con PBS estéril, se resuspendieron en 400 µL de DMEM-FBS y se agregaron a las monocapas de células utilizando una MOI de 100 bacterias/células. La placa se centrifugó a 200 x g para facilitar la interacción entre bacterias y células y se incubó a 37°C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>. Luego de 1 h de incubación, las células se lavaron 2 veces con PBS estéril y se incubó por 1 h en presencia de DMEM-FBS suplementado con gentamicina (200 µg/mL) para eliminar las bacterias extracelulares. Finalmente, las células se lavaron 3 veces con PBS estéril y se incubaron por 1, 3 y 6 h en presencia de DMEM-FBS suplementado con gentamicina (20 µg/mL). Luego de estas incubaciones, se desprendió mecánicamente la monocapa de células de cada pocillo, se recuperó las células en

suspensión, se centrifugó a 500 x g, se descartó el sobrenadante y las células sedimentadas se lavaron 2 veces con PBS estéril. Posteriormente, las células se resuspendieron en 120 µL de *Sample Diluent 1X* (tampón de lisis del sistema comercial *DetectX Direct Cyclic AMP Enzyme Immunoassay Kit* de Arbor Assays) y se dejó incubando por 20 min a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó a 4°C por 15 min a 4000 x g, se recuperaron los sobrenadantes y se almacenaron a -20°C para su posterior análisis. La concentración de cAMP de cada uno de los sobrenadantes se determinó directamente usando el sistema comercial *DetectX Direct Cyclic AMP Enzyme Immunoassay Kit* (Arbor Assays), siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **5.16.2. Ensayos de infección para determinar translocación de efectores en *D. discoideum***

Se siguieron 2 metodologías para determinar la translocación de efectores en *D. discoideum*: infección en placa y coincubación en placa.

Para la primera metodología (ensayo de infección en placa) se generaron monocapas de amebas en placas de 24 pocillos sembrando  $\sim 2 \times 10^5$  amebas/pocillo a partir de un cultivo axénico de *D. discoideum* AX4 en fase exponencial temprana. Una vez sembrada la monocapa, la placa se dejó incubando en 400 µL de tampón Soerensen por toda la noche a 22°C sin agitación. Al día siguiente, cada pocillo a infectar se lavó 3 veces con tampón Soerensen y las amebas fueron infectadas con la bacteria correspondiente, previamente lavadas con tampón Soerensen, usando una MOI de 100 bacterias/ameba. Luego de la inoculación, la placa fue centrifugada a 200 x g por 5 min y se incubó por 1 h a 22°C. Una vez transcurrida la incubación, cada monocapa se lavó 3 veces con tampón Soerensen para eliminar las bacterias extracelulares y se dejó incubando a 22°C sin agitación. Luego de 1, 3 y 6 h de incubación, se desprendió mecánicamente la monocapa de amebas de cada pocillo, se recuperó las células en suspensión, se centrifugó a 500 x g, se descartó el sobrenadante y las amebas en el sedimento se lavaron 2 veces con tampón Soerensen. Posteriormente, las células se resuspendieron en 120 µL de *Sample Diluent 1X* y se dejó incubando por 20 min a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó a 4°C por 15 min a 4000 x g, se recuperaron los sobrenadantes y se almacenaron para su posterior análisis.

La segunda metodología (coincubación en placa) fue casi idéntica a la primera, pero no se realizó el lavado para eliminar las bacterias extracelulares luego de la infección.

La concentración de cAMP en cada uno de los sobrenadantes recuperados desde de las infecciones se determinó usando el sistema comercial *DetectX Direct Cyclic AMP Enzyme Immunoassay Kit* (Arbor Assays), siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **5.17. Ensayo de infección para el monitoreo del compartimento vacuolar en el que reside *S. Typhimurium* dentro de *D. discoideum* mediante microscopía confocal**

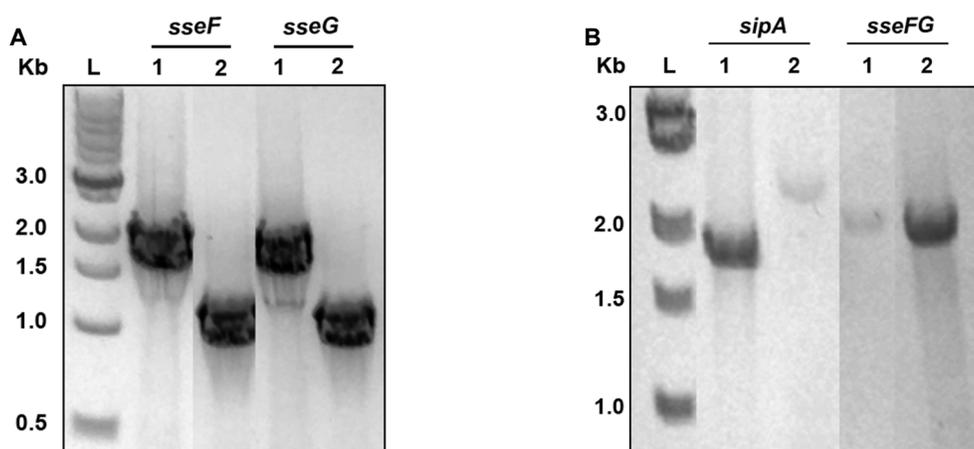
Para monitorear la formación y el posicionamiento del compartimento vacuolar donde residen las bacterias en *D. discoideum*, se observó amebas infectadas con las distintas cepas de *S. Typhimurium* mediante microscopía confocal. Para esto, se usó una cepa de *D. discoideum* que expresa una fusión de la ATPasa vacuolar VatM al reportero GFP (VatM-GFP), la que fue infectada con distintas cepas de *S. Typhimurium* (silvestre y mutantes) transformadas mediante electroporación con el plasmidio pFCcGi, que permite la expresión constitutiva de la proteína fluorescente mCherry (Figueira et al., 2013).

Las infecciones se realizaron de la siguiente manera: a partir de un cultivo axénico de *D. discoideum* en fase exponencial, se sembraron  $\sim 5 \times 10^5$  amebas suspendidas en medio HL5 por pocillo en placas  $\mu$ -Slide de 8 pocillos (Ibidi) y se incubaron durante toda la noche a 22°C. Al día siguiente, se confirmó mediante observación al microscopio óptico que las amebas se adhirieron correctamente. Luego, cada pocillo a infectar fue lavado 2 veces con tampón Soerensen y las amebas fueron infectadas con cada bacteria, previamente lavadas con tampón Soerensen, considerando una MOI de 100 bacterias/ameba. Se dejó transcurrir la infección por 1 h a 22°C y cada infección fue lavada 5 veces con tampón Soerensen para eliminar bacterias extracelulares y se dejó incubando a 22°C. Las infecciones fueron monitoreadas y fotografiadas luego de 1, 3 y 6 h de incubación para analizar si las bacterias intracelulares residen en un compartimento membraboso similar a la SCV en las células infectadas. Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio Zeiss LSM 710 equipado con un objetivo 63x 1.4 NA. Para observar la fluorescencia asociada a GFP, las muestras se excitaron a 488 nm y la emisión se detectó en el rango entre 493-549 nm. Para visualizar la fluorescencia asociada a mCherry, las muestras se excitaron a 543 nm y la emisión se detectó en el rango entre 548-679 nm. Las imágenes obtenidas se analizaron mediante los software ImageJ 1.52i y Fiji versión 2.2.1 (Schindelin et al., 2012; Schneider et al., 2012).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Determinar si los efectores SipA, SseF y SseG son requeridos para la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*

Para determinar si los efectores SipA, SseF y SseG son requeridos para la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*, se construyeron mutantes por delección de los genes que codifican dichos efectores. La delección de los genes se llevó a cabo mediante el método de recombinación “Red-swap”, el cual consiste en reemplazar el ORF que codifica cada gen por un *cassette* de resistencia a Kan, flanqueado por sitios FRT. La delección de cada uno de los genes se confirmó mediante PCR utilizando partidores que flanquean los extremos 5' y 3' del gen en cuestión. Los tamaños de los amplicones demuestran que, efectivamente, ocurrió el intercambio alélico entre los genes de interés y el *cassette* de resistencia (Figura 6). Una vez que se confirmó el reemplazo alélico, se transfirió cada alelo mutante a un fondo genético limpio mediante transducción generalizada con el fago P22. El traspaso de cada alelo se confirmó mediante PCR (resultado no mostrado), utilizando los partidores mencionados anteriormente.

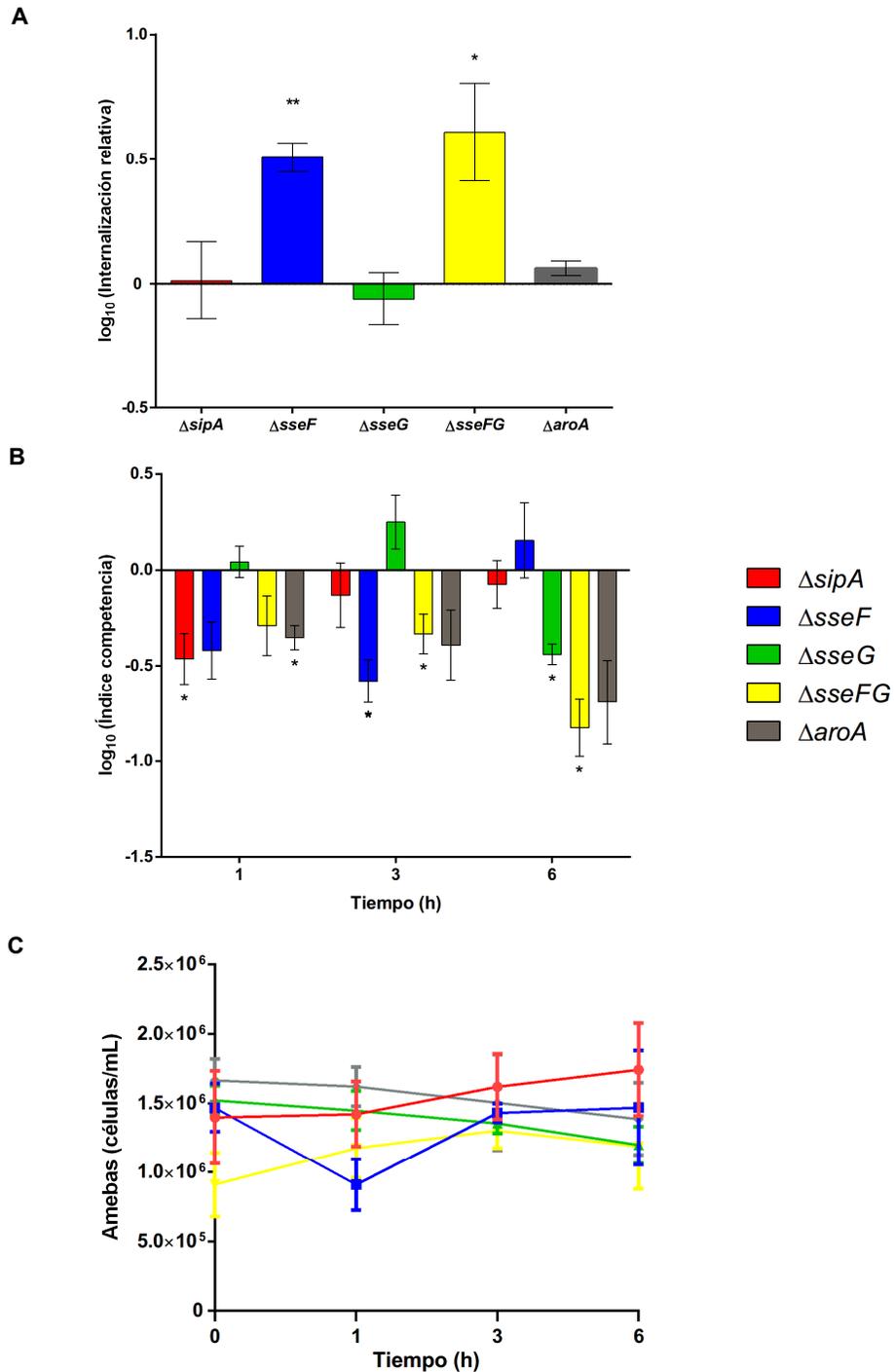


**Figura 6. Cepas mutantes derivadas de *S. Typhimurium* 14028s.** En la figura se muestran los resultados del análisis de mutantes de *S. Typhimurium* 14028s mediante PCR de colonias, usando partidores que flanquean al gen mutado. **(A)** Perfil electroforético de los productos de PCR obtenidos a partir de las cepas mutantes (carriles 1) y la cepa silvestre (carriles 2) usando partidores que flanquean los extremos de los genes *sseF* y *sseG*. **(B)** Perfil electroforético de los productos de PCR obtenidos a partir de las cepas mutantes (carriles 1) y la cepa silvestre (carriles 2) usando partidores que flanquean los extremos del gen *sipA* y partidores que flanquean el extremo 5' de *sseF* y 3' de *sseG* (*sseFG*). Los tamaños esperados corresponden a:  $\Delta sseF$ : 1,9 Kb,  $\Delta sseG$ : 2,1 Kb,  $\Delta sipA$ : 1,8 Kb y  $\Delta sseFG$ : 1,9 Kb.

Una vez que se obtuvieron las mutantes  $\Delta sipA$ ,  $\Delta sseF$ ,  $\Delta sseG$  y  $\Delta sseFG$ , se evaluó su internalización y supervivencia intracelular en *D. discoideum* mediante un ensayo de infección *in vitro*. Para este ensayo, se utilizó un cultivo axénico de la ameba que se encontraba en fase exponencial temprana ( $\sim 1 \times 10^6$  amebas/mL).

El ensayo de internalización y supervivencia intracelular (**Figura 5**) se realizó como se describe en la **Sección 5.13**. Brevemente, se coincubó *D. discoideum* durante 1 h con la cepa (o las cepas en caso de hacer ensayos por competencia) a evaluar. Luego, se lavaron las amebas para eliminar las bacterias extracelulares y se tomaron alícuotas a 1, 3 y 6 h. Para cada tiempo, una alícuota se usó para estimar la cantidad de amebas viables, mientras que otra alícuota se utilizó para determinar el título de bacterias intracelulares mediante dilución y siembra en agar LB y agar LB suplementado con Kan.

En primera instancia, se realizaron ensayos de infección simple en los que las amebas se infectaron sólo con una cepa bacteriana. Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron que existía una dispersión muy grande en los datos, por lo que se decidió realizar ensayos por competencia. A diferencia de los ensayos simples, para los ensayos por competencia se realizó cada infección con una mezcla de la bacteria silvestre y alguna de las mutantes a evaluar en una proporción 1:1. Adicionalmente, se utilizó una cepa mutante  $\Delta aroA$  como control para los ensayos de supervivencia intracelular debido a que es incapaz de sobrevivir en *D. discoideum*, pero no presenta defectos en su internalización (Riquelme et al., 2016). En la **Figura 7** se muestran resultados obtenidos a partir de los ensayos realizados. Éstos representan al menos 3 réplicas biológicas para cada cepa en cada tiempo de infección.



**Figura 7. Internalización y supervivencia intracelular de cepas de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*.** (A) Internalización de cada mutante relativa a la cepa silvestre, calculada según  $(UFC_{mutante}/UFC_{WT})_{t=0}/(UFC_{mutante}/UFC_{WT})_{in\acute{o}culo}$  y expresada como  $\log_{10}$ . (B) Índice de competencia entre una mutante específica y la cepa silvestre para cada tiempo definido, calculado según  $(UFC_{mutante}/UFC_{WT})_{t=x}/(UFC_{mutante}/UFC_{WT})_{t=0}$  y expresado como  $\log_{10}$ . (C) Amebas viables presentes a las 0, 1, 3 y 6 h post infección. Las barras de cada gráfico corresponden al promedio de al menos 3 réplicas biológicas  $\pm$  SEM. La significancia estadística se determinó usando un test  $t$  de Student de dos colas (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ).

El análisis de los valores de internalización muestra que las cepas  $\Delta sseF$  y  $\Delta sseFG$  tienen mayores niveles de internalización que la cepa silvestre, mientras que las otras cepas estudiadas presentan niveles de internalización similares a los de la cepa silvestre (**Figura 7A**). Por su parte, el análisis de los valores de supervivencia intracelular (**Figura 7B**) muestra que luego de 1 h post infección la cepa  $\Delta sipA$  presenta una menor supervivencia intracelular que la cepa silvestre en *D. discoideum*. Por otra parte, luego de 3 h post infección sólo las mutantes  $\Delta sseF$  y  $\Delta sseFG$  presentan este fenotipo. Finalmente, luego de 6 h post infección las cepas  $\Delta sseG$  y  $\Delta sseFG$  son las que presentan una menor supervivencia intracelular. Adicionalmente, la mutante  $\Delta aroA$  mostró una menor supervivencia intracelular con respecto a la cepa silvestre luego de 1 h post infección, lo cual coincide con el fenotipo esperado (**Figura 7B**). Finalmente, no se observó defectos en la supervivencia de las amebas a ningún tiempo de infección (**Figura 7C**). En su conjunto, los resultados muestran que los efectores seleccionados cumplen un rol en la internalización y/o en la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*.

## **6.2. Determinar si los efectores SipA, SseF y SseG son producidos y secretados intracelularmente en *D. discoideum***

### **6.2.1. Construcción de fusiones plasmidiales y cromosomales a CyaA'**

Para este objetivo, se propuso generar fusiones génicas de los efectores en estudio al reportero CyaA'. Esta proteína tiene actividad adenilato ciclasa dependiente de calmodulina, por lo que sólo presenta actividad cuando se encuentra en el citoplasma de células eucariontes (Miao et al., 2000).

Para generar fusiones plasmidiales, se clonaron los genes que codifican los efectores en estudio en el vector pMMB207-CyaA', el cual contiene el ORF del gen *cyaA'* bajo el control de un promotor inducible por IPTG (**Figura 8**). Primero, se amplificó el ORF de los genes de interés mediante PCR utilizando partidores que incluyen sitios de corte para las enzimas de restricción *XbaI* y *XhoI*. El producto de cada reacción se purificó y se ligó al vector comercial pGEM-T Easy. La incorporación de los fragmentos clonados se confirmó mediante PCR utilizando partidores que flanquean el sitio de multiple clonamiento (MCS) del vector, obteniéndose fragmentos con los tamaños esperados que confirmaron la correcta inserción de cada gen (**Figura 9**).

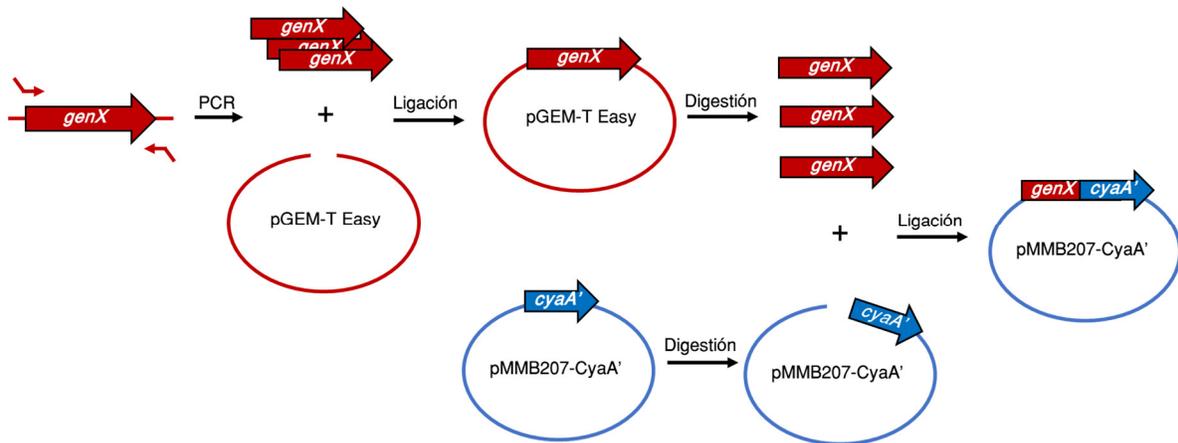


Figura 8. Esquema de la generación de fusiones plasmidiales al reportero CyaA'.

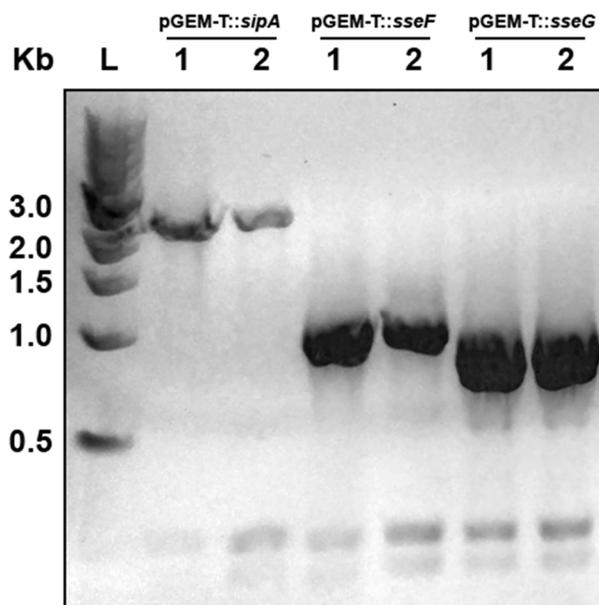
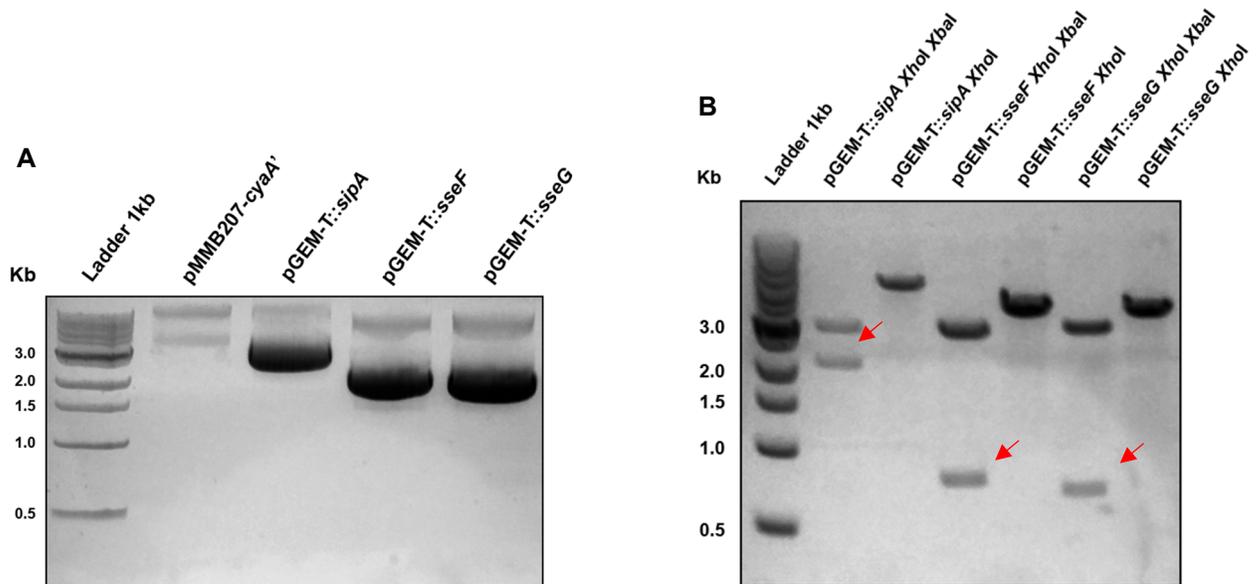


Figura 9. Confirmación de la inserción de los fragmentos de interés en el vector pGEM-T Easy. Se realizaron PCR usando los vectores construidos como DNA molde y partidores que flanquean el MCS del vector. La figura muestra el perfil electroforético de los productos de PCR obtenidos a partir de dos réplicas (1 y 2) de cada vector construido. Los tamaños esperados corresponden a ~2 Kb para pGEM-T::sipA, ~0,8 Kb para pGEM-T::sseF y ~0,7 Kb para pGEM-T::sseG. Se usó 1 Kb DNA Ladder (NEB) como estándar de tamaños.

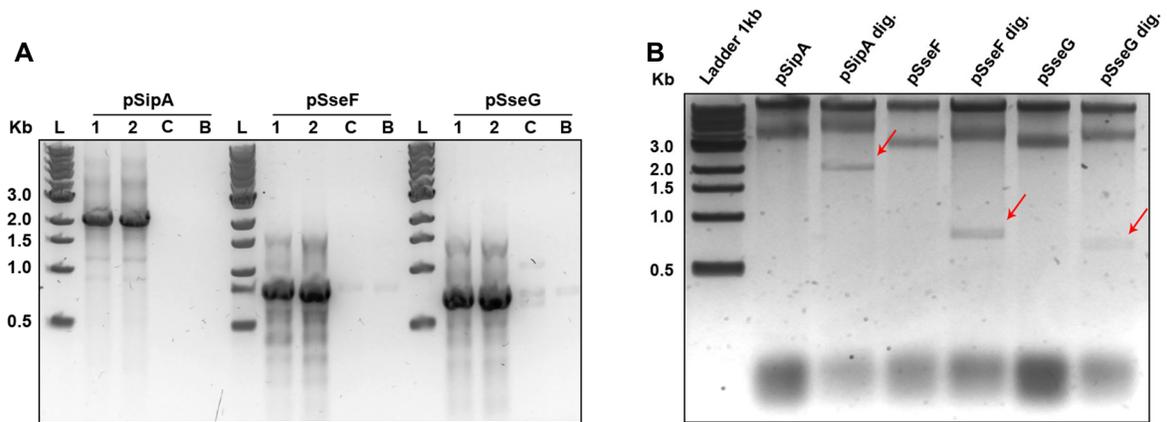
Posteriormente, se transformó *E. coli* DH5 $\alpha$  con cada uno de los plasmidios generados para replicarlos y poder extraerlos en las cantidades requeridas para el trabajo posterior. La transformación se confirmó mediante la adquisición de resistencia a ampicilina por parte de cada cepa transformada. Luego, se purificaron los plasmidios (Figura 10A) para ser digeridos con las enzimas *XhoI* y *XbaI* (Figura 10B) con el fin de obtener los fragmentos a ligar en el vector pMMB207-CyaA'. El análisis del gel muestra que se liberaron fragmentos

del tamaño esperado, similares a los amplicones de la **Figura 9**. Una vez realizadas ambas digestiones, se purificó y se almacenó cada fragmento obtenido para su uso posterior.



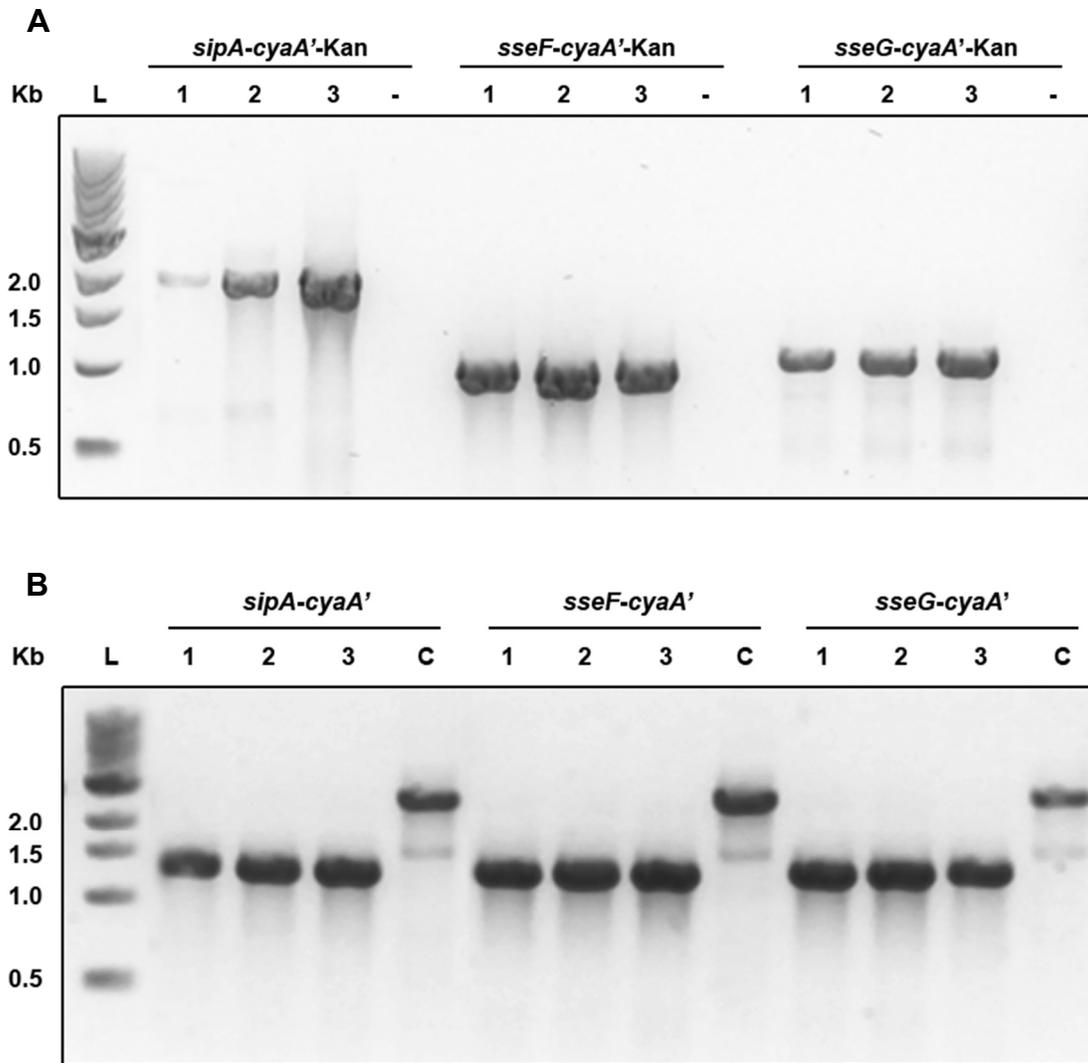
**Figura 10. Digestión de los plasmidios derivados de pGEM-T Easy con las enzimas *XhoI* y *XbaI*.** (A) Perfil electroforético de los plasmidios pGEM-T::*sipA*, pGEM-T::*sseF*, y pGEM-T::*sseG* extraídos desde *E. coli* DH5 $\alpha$ . (B) Digestión de los plasmidios con las enzimas *XhoI* y *XbaI*. Los tamaños esperados para los fragmentos liberados luego de ambas digestiones corresponden a ~2 Kb para pGEM-T::*sipA*, ~0,8 Kb para pGEM-T::*sseF* y ~0,7 Kb para pGEM-T::*sseG*. Las flechas indican los fragmentos que poseen el tamaño esperado. En todos los casos se usó 1 Kb DNA Ladder (NEB) como estándar de tamaños.

Paralelamente, se extrajo el plasmidio pMMB207-CyaA' desde *E. coli* DH5 $\alpha$ . Una vez extraído, se digirió con las enzimas *XbaI* y *XhoI* y el plasmidio linealizado se purificó desde un gel de agarosa. Luego, se ligaron los fragmentos obtenidos anteriormente (**Figura 10B**) al vector pMMB207-CyaA' y los plasmidios resultantes se transformaron en *E. coli* DH5 $\alpha$ . La comprobación de la ligación de cada uno de los fragmentos se hizo mediante PCR y digestión con las enzimas *XbaI* y *XhoI* (**Figura 11**). Una vez comprobada la inserción, se purificó cada vector construido (pSipA, pSseF y pSseG) y se transformó en *S. Typhimurium* 14028s, obteniéndose las cepas WT/pSipA, WT/pSseF y WT/pSseG que se usaron para estudiar la expresión y secreción de cada proteína de fusión.



**Figura 11. Confirmación de la inserción de los fragmentos de interés en el vector pMMB207-CyaA'.** **(A)** Se realizaron PCR usando como DNA molde los vectores construidos y purificados, y se usaron partidores que hibridan en los fragmentos insertados en el vector. **(B)** Digestión de los plasmidios recombinantes con las enzimas *XhoI* y *XbaI*. Los tamaños esperados para las amplificaciones por PCR y para los fragmentos liberados luego de ambas digestiones corresponden a ~2 Kb para pGEM-T::*sipA*, ~0,8 Kb para pGEM-T::*sseF* y ~0,7 Kb para pGEM-T::*sseG*. En todos los casos, se usó 1 Kb DNA Ladder (NEB) como estándar de tamaños. Las flechas indican los fragmentos que poseen el tamaño esperado.

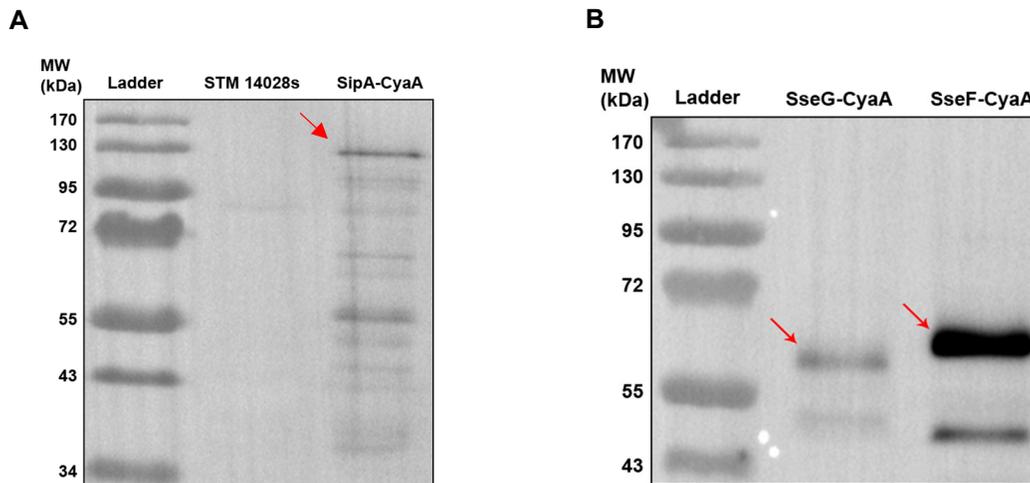
Para generar las fusiones cromosomales a *CyaA'*, se transformó *S. Typhimurium* 14028s previamente transformada con pKD46 con los productos de PCR obtenidos a partir de la amplificación desde el vector pCyaA'-Kan (Fernández et al., 2021) (ver **Sección 5.12.2**). La recombinación de los productos de PCR en el cromosoma bacteriano se comprobó mediante PCR (**Figura 12A**). Posteriormente, cada cepa construida se transformó con el plasmidio pCP20, el cual codifica la recombinasa Flp que permite la remoción del *cassette* de resistencia a Kan mediante recombinación entre los sitios *Flp recognition target* (FRT) que lo flanquean. La remoción del *cassette* se confirmó mediante PCR (**Figura 12B**), obteniéndose las cepas *sipA-cyaA'*, *sseF-cyaA'* y *sseG-cyaA'*.



**Figura 12. Comprobación de las mutantes de *S. Typhimurium* 14028s con fusiones cromosomales a *cyaA'*** (A) Para comprobar la inserción de *cyaA'*-Kan en el cromosoma bacteriano, se realizaron PCR de colonias con los partidores Out5 (que hibrida en la región río arriba de cada gen) y CyaRev (que hibrida en la región codificante de *cyaA'*). En cada caso se obtuvieron bandas correspondientes al tamaño esperado (~2 Kb, ~0,8 Kb, y ~0,7 Kb para *sipA-cyaA'*-Kan, *sseF-cyaA'*-Kan y *sseG-cyaA'*-Kan, respectivamente). No hubo amplificación al utilizar la cepa silvestre (-). (B) Para comprobar la remoción del *cassette* de resistencia a Kan, se realizaron PCR de colonias con los partidores *cyaA*(F)-BamHI (que hibrida en la región codificante de *cyaA'*) y pCLF4(R)-BamHI-XhoI (que hibrida río abajo del *cassette* de resistencia a Kan). En todos los casos se obtuvo bandas correspondientes al tamaño esperado (~1 Kb). En los gels se usó 1 Kb DNA Ladder (NEB) como estándar de tamaños (carril L).

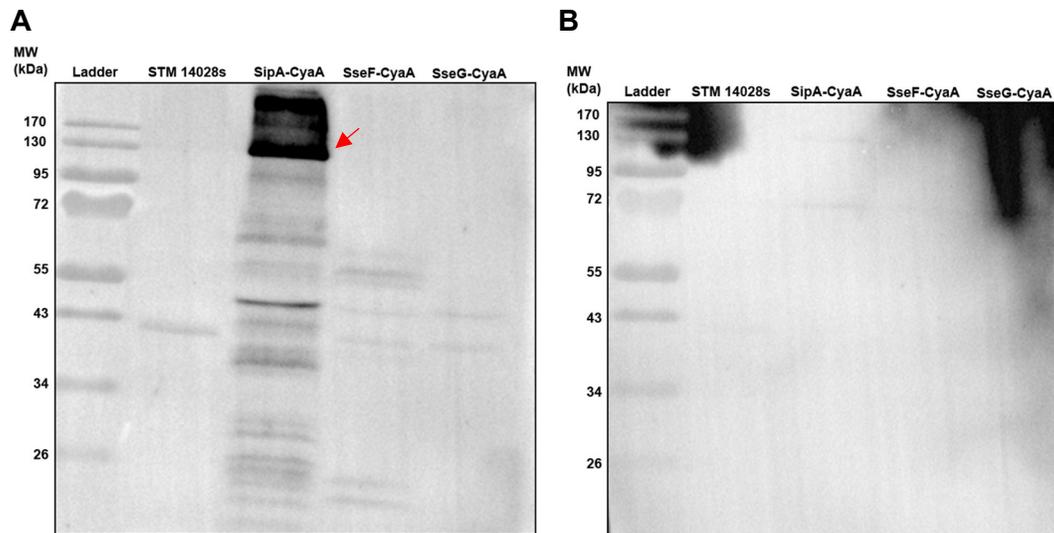
### 6.2.2. Inmunodetección de fusiones a CyaA'

Se comenzó realizando ensayos de *Western blot* con muestras de lisados bacterianos obtenidos a partir de bacterias que poseen las fusiones plasmidiales de los efectores SipA, SseF y SseG al reportero CyaA', el cual se utilizó como epítotope para la inmunodetección. Los cultivos bacterianos correspondientes fueron crecidos a 37°C con agitación en LB suplementado con IPTG. Bajo estas condiciones, en el carril correspondiente a la fusión SipA-CyaA' (**Figura 13A**) se detectó una proteína cuya masa molecular coincide con el valor esperado (110 kDa). Por otra parte, en los carriles correspondientes a las proteínas de fusión SseF-CyaA' y SseG-CyaA' (**Figura 13B**), fue posible detectar proteínas con masas moleculares de ~60 kDa, que no coinciden con las masas moleculares esperadas para ambas proteínas de fusión (70 kDa y 68 kDa, respectivamente). Sin embargo, ambas bandas presentan una diferencia proporcional similar a la que tienen SseF y SseG sin la fusión (27 kDa y 25 kDa, respectivamente), lo que sugiere que las fusiones plasmidiales SseF-CyaA' y SseG-CyaA' se producen correctamente. Cabe mencionar que hay presencia de fragmentos de menor tamaño en todos los carriles, los que podrían corresponder a proteínas de fusión que fueron degradadas, o al reportero CyaA' por sí solo, que presenta una masa molecular teórica de 43 kDa. No se detectó ninguna banda en muestras obtenidas a partir de la cepa silvestre



**Figura 13. Inmunodetección en lisados bacterianos de las proteínas de fusión a CyaA' codificadas en los plasmidios pSipA, pSseF y pSseG.** Se prepararon lisados totales de bacterias cultivadas en (A) medio LB o (B) medio mínimo N, suplementados con IPTG, y se analizaron mediante *Western blot* usando un anticuerpo anti-CyaA'. Las flechas rojas señalan las bandas correspondientes a cada fusión.

Paralelamente, los sobrenadantes de los cultivos mencionados se analizaron mediante *Western blot* para determinar si las proteínas de fusión son secretadas por *S. Tiphymurium*. En este caso, sólo se pudo detectar la presencia de la proteína de fusión SipA-CyaA', observándose una banda de ~110 kDa, similar a la descrita anteriormente (**Figura 14A**). Las fusiones SseF-CyaA' y SseG-CyaA' no fueron detectadas (**Figura 14B**). Para comprobar si la fusión SipA-CyaA' detectada corresponde a una proteína secretada al sobrenadante de cultivo y no a una contaminación resultante de la lisis bacteriana, se realizó una deshíbridaación a la membrana y se reveló usando un anticuerpo específico para la proteína chaperona citosólica DnaK, la cual no debería detectarse en sobrenadantes de cultivos bacterianos. Como se observa en la **Figura 14B**, no se detectaron bandas correspondientes a la masa molecular esperada de ~70 kDa, por lo que se puede concluir que la fusión plasmidial SipA-CyaA' se secreta al medio de cultivo, mientras que no se pudo detectar la secreción al sobrenadante de las fusiones SseF-CyaA' y SseG-CyaA'.

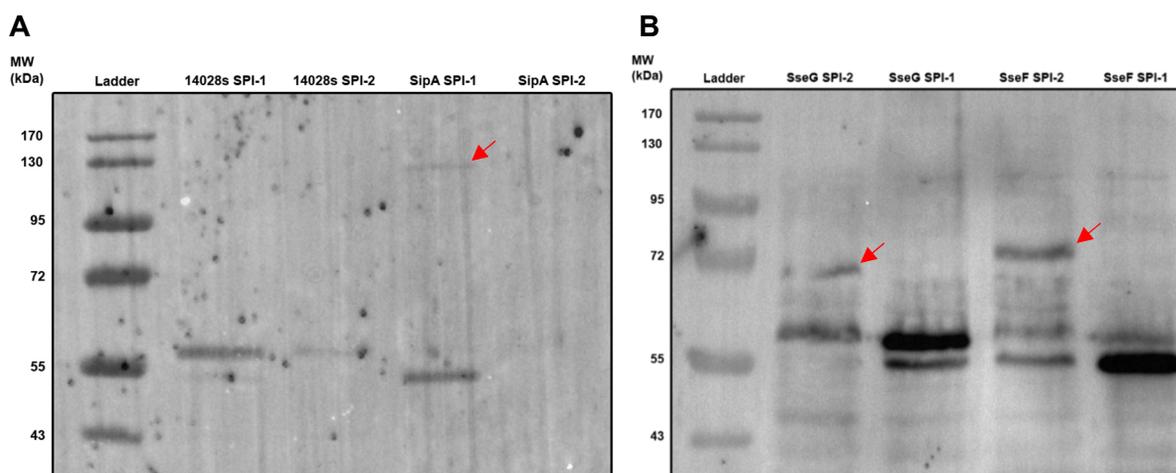


**Figura 14. Inmunodetección en sobrenadantes de cultivos de las proteínas de fusión a CyaA' codificadas en los plasmidios pSipA, pSseF y pSseG.** Se purificó proteínas a partir de sobrenadantes obtenidos de cultivos crecidos en medio LB suplementado con IPTG y se analizaron mediante *Western blot* usando **(A)** un anticuerpo anti-CyaA' y **(B)** con un anticuerpo anti DnaK. La flecha roja señala la banda inmunodetectada correspondiente a la fusión SipA-CyaA'.

Para el caso de las fusiones cromosomales a CyaA', se realizaron *Western blots* a partir de lisados totales bacterianos. Debido a que la expresión de cada proteína de fusión se encuentra bajo el control de su promotor nativo, los cultivos fueron crecidos en condiciones inductoras de SPI-1 (LB conteniendo 300 mM NaCl) para inducir la expresión de SipA-CyaA'

y condiciones inductoras de SPI-2 (medio mínimo N conteniendo 10  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>) para inducir la expresión de SseF-CyaA' y SseG-CyaA'.

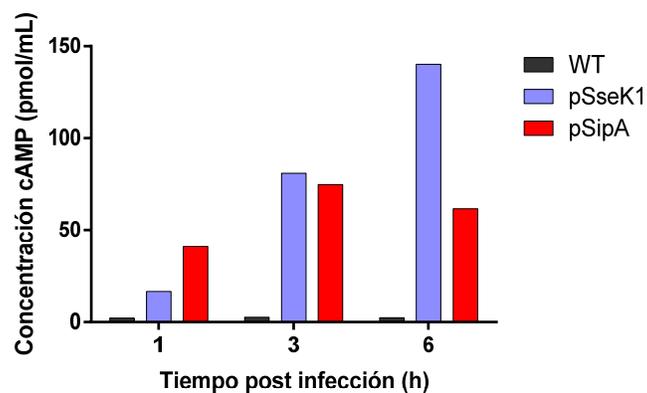
Se detectó la presencia de las tres proteínas de fusión. En específico, la proteína de fusión SipA-CyaA' fue detectada en la condición inductora de la SPI-1, evidenciado por la presencia de una banda de ~110 kDa que no fue detectada en la condición inductora de la SPI-2 (**Figura 15A**). Por su parte, las proteínas de fusión SseF-CyaA' y SseG-CyaA' fueron detectadas en la condición inductora de la SPI-2, evidenciado por la presencia de bandas de ~70 kDa que no fueron detectadas en la condición inductora de la SPI-1 (**Figura 15B**). Lo anterior confirma que la expresión de estas proteínas, posterior a la fusión con CyaA', ocurre en respuesta a las condiciones ambientales que inducen la expresión de los genes nativos correspondientes. Debido a que se logró inmunodetectar cada una de las proteínas de fusión, ya sea codificada en un plasmidio o en el cromosoma de la bacteria, fue posible evaluar su translocación desde la bacteria hacia la célula hospedero en un ensayo de infección.



**Figura 15. Inmunodetección en lisados bacterianos de las proteínas de fusión a CyaA' codificadas en el cromosoma de las cepas *sipA-cyaA'*, *sseF-cyaA'* y *sseG-cyaA'*.** Se prepararon lisados totales de bacterias cultivadas en condiciones inductoras de la SPI-1 y SPI-2, a partir de cultivos de la cepa silvestre y de la cepa que expresa la fusión SipA-CyaA' (**A**) y a partir de las cepas que expresan la fusión SseF-CyaA' y SseG-CyaA' (**B**). Las flechas rojas señalan las bandas correspondientes a cada fusión.

### 6.2.3. Translocación de las proteínas SipA, SseF y SseG

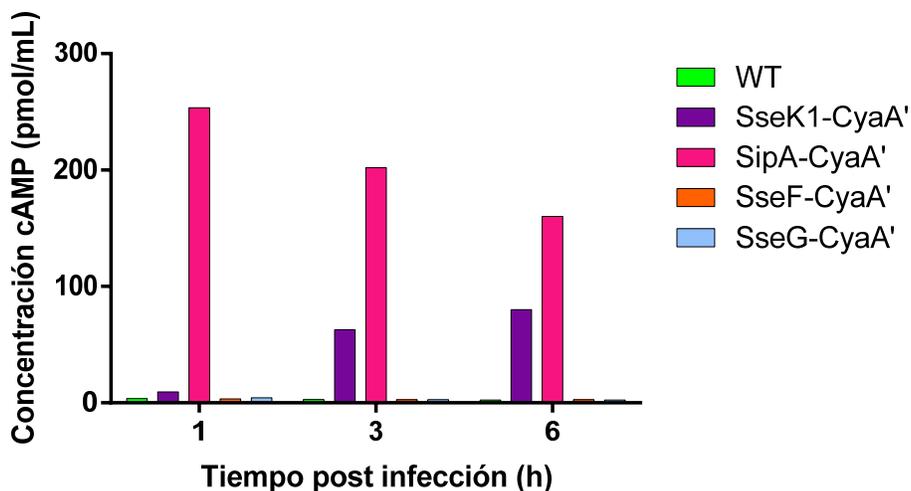
Como se mencionó, *S. Typhimurium* requiere los T3SS-1 y T3SS-2 para sobrevivir intracelularmente en *D. discoideum* (Riquelme et al., 2016). Por su parte, en esta tesis se observó que los efectores SipA, SseF y SseG son importantes para la supervivencia intracelular de la bacteria (**Figura 7**), por lo que quisimos determinar si estos efectores son translocados al citoplasma de la ameba durante el proceso infeccioso. Como primera aproximación, se realizaron ensayos de infección a células HeLa usando cepas que expresan fusiones plasmidiales de los efectores a CyaA'. En específico, se usó una cepa que expresa SseK1-CyaA' como control positivo de translocación, ya que previamente se determinó que es secretada hacia el citoplasma de células HeLa siguiendo la misma metodología que en esta tesis (Baisón-Olmo et al., 2015). Por otra parte, para este experimento sólo se analizó la cepa que expresa la fusión plasmidial SipA-CyaA' debido a que fue la única cepa en la que se pudo detectar una secreción adecuada de la fusión al medio de cultivo (**Figura 14**). En la **Figura 16** se muestran los resultados de estos ensayos, donde se observa que las células infectadas con la cepa que expresa la fusión plasmidial SipA-CyaA' presentan un aumento en la concentración de cAMP en comparación con la concentración obtenida en la infección con la cepa silvestre. De la misma manera, la cepa que expresa la fusión plasmidial SseK1-CyaA' (que corresponde al control positivo de experimento) también genera un aumento en la concentración de cAMP en las células infectadas en comparación con la cepa silvestre. Estos resultados confirman que ambas proteínas, SipA-CyaA' y SseK1-CyaA', son translocadas al citoplasma de células HeLa durante el proceso infeccioso.



**Figura 16. Medición de la concentración de cAMP en infecciones de células HeLa con cepas de *S. Typhimurium* que expresan fusiones plasmidiales a CyaA'.** Se infectaron células HeLa con las cepas que portan los plasmidios pSseK1 y pSipA. A los tiempos indicados, las células se lisaron y se determinó el nivel de cAMP en los lisados mediante ELISA (Cyclic AMP Direct ELISA Kit, Arbor Assays).

Si bien se logró determinar que la fusión plasmidial SipA-CyaA' es translocada al citoplasma de células HeLa durante el proceso infeccioso, se decidió repetir estos ensayos usando las cepas que expresan fusiones cromosomales de los tres efectores en estudio a CyaA', debido a que poseen la gran ventaja de que la expresión de cada fusión está bajo el control de los promotores nativos de *S. Typhimurium*.

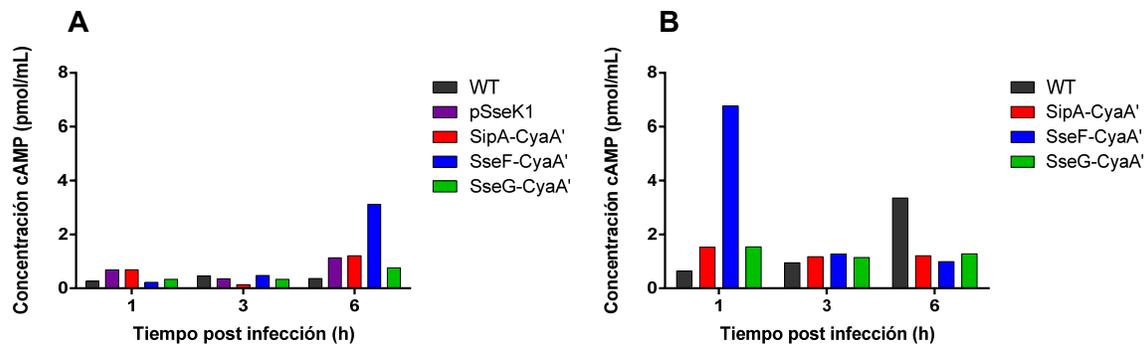
Como primera aproximación, fue necesario comprobar si los efectores son translocados en un modelo clásico de infección. Para esto, nuevamente se realizaron ensayos de infección utilizando la línea celular HeLa como célula hospedera, ya que la translocación de estos efectores ya ha sido demostrada en este sistema (Kuhle & Hensel, 2002; Brawn et al., 2007). También se utilizó como control positivo la cepa que expresa la fusión plasmidial SseK1-CyaA'. A partir de estas infecciones, se tomaron alícuotas a distintos tiempos, se lisaron las células infectadas y se midió la concentración de cAMP a cada tiempo definido (**Figura 17**). La cepa que expresa la fusión cromosomal SipA-CyaA' generó mayores niveles de cAMP en todos los tiempos de infección evaluados, en comparación a la cepa silvestre. La cepa control que expresa la fusión plasmidial SseK1-CyaA' también generó una mayor concentración de cAMP, pero sólo a las 3 y 6 h post infección. Por su parte, las cepas que expresan las fusiones cromosomales SseF-CyaA' y SseG-CyaA' no generaron concentraciones de cAMP diferentes a la cepa silvestre, contrastando con lo que se esperaba (**Figura 17**).



**Figura 17. Medición de la concentración de cAMP en infecciones de células HeLa con cepas de *S. Typhimurium* que expresan fusiones cromosomales a CyaA'.** Se infectaron células HeLa con las cepas que expresan fusiones cromosomales de los efectores a CyaA'. A los tiempos indicados, las células se lisaron y se determinó el nivel de cAMP en los lisados mediante ELISA (Cyclic AMP Direct ELISA Kit, Arbor Assays).

Debido a que la cepa que expresa la fusión cromosomal SipA-CyaA' generó mayores niveles de cAMP que la cepa silvestre en infecciones de células HeLa, se puede concluir que las fusiones cromosomales construidas bajo la metodología usada en esta tesis son funcionales y servirían para detectar la translocación de los efectores en *D. discoideum*.

Con esto en mente, se realizaron ensayos de translocación infectando *D. discoideum*. Se comenzó realizando ensayos de infección en placas de 24 pocillos, usando monocapas de la ameba y cepas que expresan fusiones cromosomales de los efectores en estudio. Inesperadamente, los niveles de cAMP detectados en todos los casos analizados fueron muy bajos en comparación con los detectados en las infecciones de células HeLa con la cepa que expresa la fusión cromosomal SipA-CyaA' (comparar **Figura 18A** y **Figura 17**). Debido a esto, se cambió el ensayo de infección a un ensayo de coincubación en el cual no se eliminan las bacterias extracelulares. A pesar de estos cambios, los niveles de cAMP medidos en todos los casos analizados todavía fueron muy bajos en comparación con los resultados del ensayo de infección usando células HeLa (comparar **Figura 18B** y **Figura 17**). Cabe destacar que en ambos ensayos los niveles de cAMP detectados en infecciones con todas las cepas fueron muy similares a los detectados en infecciones con la cepa silvestre (**Figura 18**), sugiriendo que las fusiones analizadas no poseen actividad enzimática en *D. discoideum* bajo las condiciones experimentales utilizadas. Tomando en cuenta los resultados anteriores, no fue posible determinar la translocación de los efectores en SipA, SseF y SseG en infecciones de *D. discoideum*.



**Figura 18. Medición de la concentración de cAMP en infecciones de *D. discoideum* con cepas de *S. Typhimurium* que expresan fusiones cromosomales a CyaA'.** Se realizaron mediciones de cAMP para detectar actividad adenilato ciclasa de las distintas fusiones cromosomales de los efectores SipA, SseF y SseG a CyaA' mediante ELISA (Cyclic AMP Direct ELISA Kit, Arbor Assays), con los siguientes protocolos de infección. **(A)** Ensayo de infección en placas de cultivo de 24 pocillos. **(B)** Ensayo de coincubación en placas de cultivo de 24 pocillos.

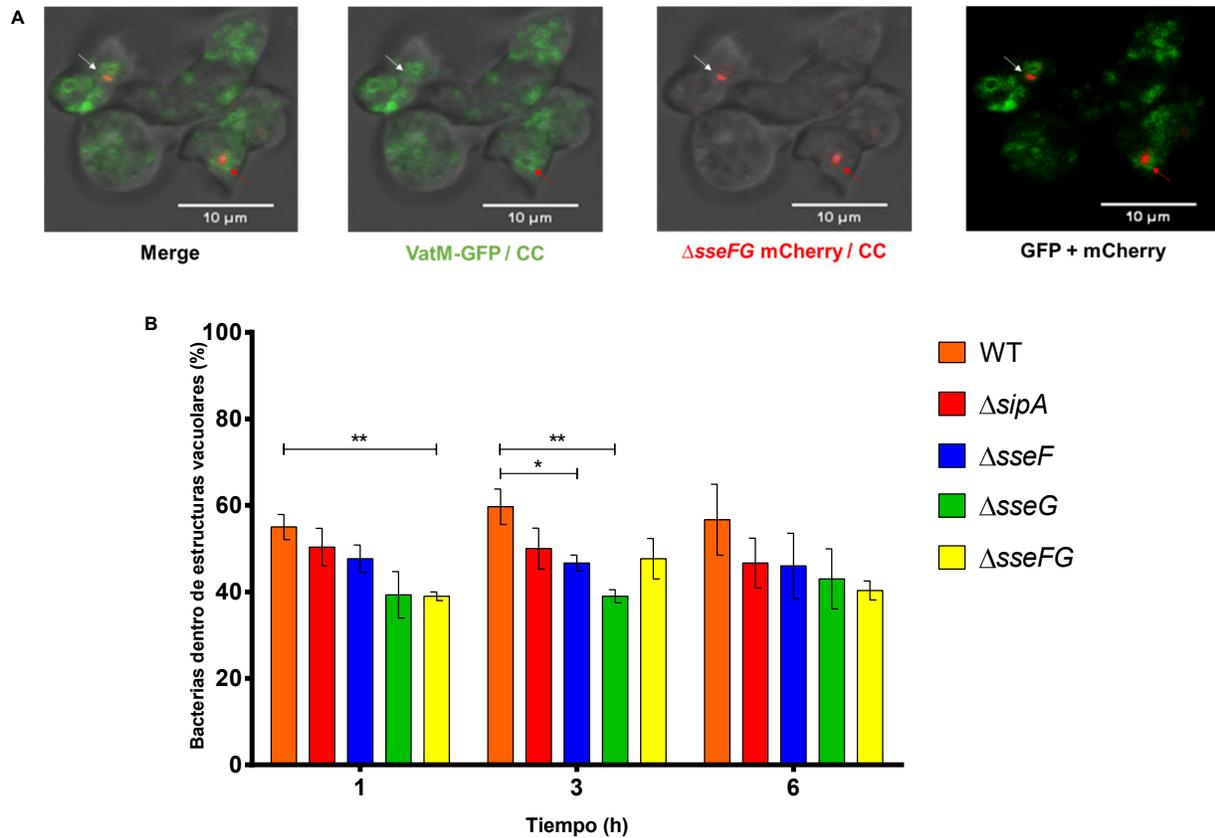
### **6.3. Contribución de los efectores SipA, SseF y SseG en la capacidad de *S. Typhimurium* para residir en compartimentos vacuolares dentro de *D. discoideum***

Como se señaló, los efectores SipA, SseF y SseG contribuyen al correcto posicionamiento de la SCV en células de mamíferos. Por su parte, resultados de nuestro laboratorio indican que *S. Typhimurium* reside dentro de *D. discoideum* en una estructura vacuolar similar a la SCV (Valenzuela et al., 2021), por lo que en esta tesis se propuso determinar si los efectores mencionados contribuyen a la capacidad de *S. Typhimurium* para residir en estructuras vacuolares dentro de la ameba.

Como primer paso, se transformaron las cepas 14028s,  $\Delta sipA$ ,  $\Delta sseF$ ,  $\Delta sseG$  y  $\Delta sseFG$  con el plasmidio pFCcGi, el cual permite la expresión constitutiva de la proteína fluorescente roja mCherry (Figueira et al., 2013). La transformación se confirmó mediante la adquisición de resistencia ampicilina por parte de cada cepa y por la presencia de colonias de color rojo en las placas donde se mantenían aisladas las bacterias.

Una vez confirmada la adquisición del pFCcGi, las bacterias se usaron para infectar una cepa de *D. discoideum* que expresa una fusión de la ATPasa vacuolar VatM a GFP. Luego de 1, 3 y 6 h post infección, las amebas infectadas se observaron en un microscopio confocal y se analizaron al menos 25 amebas infectadas con cada cepa analizada (**Figura 19A**). A partir de estas observaciones, se determinó el porcentaje de bacterias intracelulares que residen dentro de estructuras vacuolares que presentan fluorescencia verde (**Figura 19B**). Nuestros resultados muestran que luego de 1 h post infección la fracción de bacterias intracelulares de la cepa  $\Delta sseFG$  en el interior de estas estructuras vacuolares es menor en comparación con la cepa silvestre, mientras que luego de 3 h post infección las cepas  $\Delta sseF$  y  $\Delta sseG$  son las que presentan este fenotipo. Finalmente, luego de 6 h post infección ninguna cepa presentó diferencias con el fenotipo observado en la cepa silvestre.

En su conjunto, estos resultados indican que los efectores estudiados en esta tesis contribuyen a la capacidad de *S. Typhimurium* de residir en compartimentos vacuolares VatM<sup>+</sup> dentro de *D. discoideum*.



**Figura 19. Contribución de los efectores SipA, SseF y SseG en la localización intracelular de *S. Typhimurium* en compartimentos vacuolares *VatM*<sup>+</sup> de *D. discoideum*.** Se infectó *D. discoideum* AX2 *VatM*-GFP con distintas cepas de *S. Typhimurium* transformadas con el plasmidio pFCcGi, que permite la expresión constitutiva de la proteína fluorescente roja mCherry. Posteriormente, se obtuvieron imágenes utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 700 equipado con un objetivo Plan-Apochromat 40x. **(A)** Fotos representativas obtenidas a las 3 h post infección usando la cepa *sseFG*/pFCcGi. La flecha blanca indica una bacteria fuera de la estructura vacuolar y la flecha roja indica una bacteria dentro de la estructura vacuolar. **(B)** Porcentaje de bacterias que residen dentro de estructuras vacuolares. Las barras de cada gráfico corresponden al promedio de 3 réplicas biológicas  $\pm$  SEM. La significancia estadística se determinó usando un test *t* de Student de dos colas ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,005$ ).

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1. Los efectores SipA, SseF y SseG son importantes para la internalización y supervivencia de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*

En esta tesis, se buscó ampliar el conocimiento que se tiene actualmente sobre el ciclo de vida de *Salmonella* en el ambiente. En particular, se estudió la importancia que tienen los efectores SipA, SseF y SseG en la interacción entre *S. Typhimurium* y *D. discoideum*. Para esto, se propuso estudiar si estos efectores participan en la supervivencia intracelular de la bacteria, si son secretados dentro de la ameba y si contribuyen a la capacidad de la bacteria de residir en compartimentos vacuolares dentro de la ameba.

Se realizaron ensayos de infección por competencia para estudiar si los efectores mencionados afectan la capacidad de *S. Typhimurium* para sobrevivir intracelularmente en *D. discoideum*. Para esto, se construyeron las mutantes  $\Delta sipA$ ,  $\Delta sseF$  y  $\Delta sseG$  mediante el método de mutagénesis por reemplazo alélico, el que permite reemplazar el gen de interés por un *cassette* de resistencia a antibióticos (kanamicina en el caso de este trabajo). Adicionalmente, se construyó una mutante doble  $\Delta sseFG$ , que presenta la delección de los genes *sseF* y *sseG*, debido a que las proteínas SseF y SseG participan de forma conjunta en el posicionamiento intracelular de *S. Typhimurium* (Deiwick et al., 2006). Por esto, se esperaba que el fenotipo observado para los experimentos realizados con esta doble mutante fuese mayor al que se pudiera observar en las mutantes individuales  $\Delta sseF$  y  $\Delta sseG$ .

Se escogió el ensayo de infección por competencia debido a que, al infectar las amebas con una mezcla entre una mutante y la cepa silvestre, esta última sirve como control interno. Esto permite disminuir la dispersión de los datos experimentales (Segura et al., 2004).

Analizando los perfiles de internalización de cada cepa, se observó que las mutante  $\Delta sseF$  y  $\Delta sseFG$  presentan una mayor internalización en comparación a la cepa silvestre. Si bien en la literatura no se ha descrito que SseF participe en la internalización de la bacteria en la célula hospedero, resultados de nuestro laboratorio han mostrado que una mutante estructural del T3SS-2 presenta mayor internalización en ensayos de infección en *D. discoideum* (Riquelme et al., 2016), por lo que se puede esperar que algunos de los efectores secretados por este T3SS puedan explicar este fenotipo.

Con respecto a los índices de competencia obtenidos, se observa que la cepa  $\Delta sipA$  presenta defectos en su supervivencia intracelular luego de 1 h post infección, mientras que luego de 3 y 6 h post infección la supervivencia intracelular es similar a la de la cepa silvestre. SipA es un efector relevante a tiempos tempranos de infección, ya que entre sus funciones está promover ondulaciones de membrana en la célula hospedero, evitar que la SCV se fusione con los lisosomas y controlar el posicionamiento de la bacteria dentro de la célula hospedera (McGhie et al., 2001; Singh et al., 2018; Brawn et al., 2007). Por esto, se esperaba que la cepa  $\Delta sipA$  presentara un defecto en la supervivencia intracelular a tiempos tempranos de la infección. Sin embargo, en ensayos de infección en fibroblastos NIH3T3 se observó que una mutante *sipA* no presenta defectos en su supervivencia intracelular a tiempos tempranos (Brawn et al., 2007). Estas diferencias pueden explicarse porque (i) el tipo de ensayo es diferente al realizado en esta tesis, en el cual los datos a cada tiempo están normalizados con respecto a la supervivencia de la cepa silvestre y (ii) *D. discoideum* es un fagocito profesional que se alimenta de bacterias, por lo que es posible que la bacteria enfrente condiciones más adversas en esta ameba que cuando se encuentra dentro de células no fagocíticas. Para resistir estas condiciones adversas, se hace más importante la correcta formación de la SCV, por lo que la ausencia de SipA afectaría de mayor manera la supervivencia intracelular de la bacteria. Además, cabe destacar que aún no ha sido muy estudiada la interacción entre *S. Typhimurium* y *D. discoideum*, por lo que no resulta extraño encontrar fenotipos que no coincidan con lo publicado en la literatura respecto a la interacción de esta bacteria con otras células eucariontes. Por su parte, luego de 3 y 6 h post infección, la supervivencia intracelular de la mutante  $\Delta sipA$  es similar a la de la cepa silvestre, resultado que coincide con lo publicado en otros trabajos (Brawn et al., 2007).

La cepa  $\Delta sseF$  presenta defectos significativos en su supervivencia intracelular luego de 3 h post infección, mientras que luego de 1 y 6 h post infección no se observan diferencias significativas. Por su parte, la cepa  $\Delta sseG$  sólo presenta menor supervivencia intracelular a las 6 h post infección. Los efectores SseF y SseG participan regulando el correcto posicionamiento de la SCV en células epiteliales de mamíferos, siendo importantes en el tiempo intermedio en la biogénesis de la vacuola (Steele-Mortimer, 2008). Por esto, es esperable que las cepas  $\Delta sseF$  y  $\Delta sseG$  presenten defectos en su supervivencia intracelular a las 3 y 6 h post infección. Lo anterior se hace más evidente al observar los índices de competencia de la cepa  $\Delta sseFG$  (mutante que carece de los genes *sseF* y *sseG*), la cual presenta defectos significativos en su supervivencia a las 3 y 6 h post infección, lo

que coincide con observaciones publicadas anteriormente en infecciones de macrófagos RAW264.7 y células HeLa (Kuhle & Hensel, 2002; Deiwick et al., 2006; Yu et al., 2016; Feng et al., 2018). Cabe destacar que las cepas  $\Delta$ sseF y  $\Delta$ sseFG presentan una mayor internalización en comparación con la cepa silvestre, pero sobreviven menos dentro de la ameba. Como se mencionó, no existe evidencia que describa roles del efector SseF en la internalización de *S. Typhimurium* en su célula hospedera, por lo que este resultado correspondería a un nuevo fenotipo asociado al efector SseF en la interacción de *S. Typhimurium* con *D. discoideum*. Cabe mencionar que se ha observado que *D. discoideum* puede discriminar entre cepas bacterianas, prefiriendo un tipo de bacteria sobre otras para fagocitarla (Nasser et al., 2013; Rashidi & Otrowski, 2018; Rashidi & Otrowski, 2019), lo que podría explicar el fenotipo observado.

Dentro de los ensayos de supervivencia se incluyó como control una cepa  $\Delta$ aroA, ya que es una cepa con virulencia atenuada en infecciones de células de mamíferos debido a que presenta deficiencias en la síntesis de aminoácidos aromáticos y defectos en la síntesis de sus membranas (Sebkova et al., 2008). Cabe destacar que nuestro grupo reportó que esta cepa presenta defectos en su supervivencia intracelular en *D. discoideum* (Riquelme et al., 2006). Por esto, se esperaba que esta cepa presentara defectos en su supervivencia intracelular en la ameba y los resultados obtenidos coinciden con lo esperado. En conjunto, estos resultados indican que los efectores SipA, SseF y SseG de *S. Typhimurium* son necesarios para su supervivencia intracelular en *D. discoideum* en los tiempos de infección analizados.

## **7.2. Estudio de la translocación de los efectores SipA, SseF y SseG mediante fusiones al reportero CyaA'**

Un método ampliamente usado para estudiar translocación de efectores bacterianos es la fusión de los efectores de interés a diferentes epítopes para detectar la presencia de la proteína. Estos ensayos pueden ser *in vitro*, en los que se detecta la presencia de la fusión en sobrenadantes o lisados bacterianos, o *in vivo*, en los que se detecta la proteína dentro de una célula hospedera. En esta tesis, se construyeron fusiones de los efectores SipA, SseF y SseG a la proteína reportera CyaA', que corresponde a una adenilato ciclasa dependiente de calmodulina de *Bordetella pertussis*. La elección de este reportero se basó en que puede ser detectado mediante *Western blot* o mediante ensayos enzimáticos,

midiendo cambios en la concentración de cAMP dentro de una célula infectada por cepas que expresen esta fusión (Sory et al., 1995; Geddes et al., 2005).

Como primer acercamiento al estudio de translocación, se construyeron los plasmidios pSipA, pSseF y pSseG, que codifican fusiones de los efectores en estudio a CyaA' y cuya expresión es inducible por IPTG. La principal ventaja de este método es poder controlar la cantidad de proteína de fusión producida por la bacteria, mediante la variación en la concentración de IPTG que se agrega al cultivo bacteriano.

La expresión de estas fusiones se comprobó mediante *Western blot* a partir de lisados bacterianos usando un anticuerpo contra CyaA'. Un aspecto a mencionar es que, en el caso de las fusiones SseF-CyaA' y SseG-CyaA' la masa molecular de las bandas detectadas (~60 kDa para ambas proteínas de fusión) no corresponden a las masas moleculares esperadas (70 kDa y 68 kDa, respectivamente). Sin embargo, las masas moleculares observadas de las fusiones cromosomales SseF-CyaA' y SseG-CyaA' sí corresponden a las esperadas. Una posible explicación a esta discrepancia es que, al ser fusiones plasmidiales, es posible que sus masas moleculares sean menores a las obtenidas a partir de las fusiones cromosomales. Esto podría deberse a que el inicio de la traducción, en condiciones nativas, sea diferente a los ORFs clonados. Una alternativa para corroborar esta idea es secuenciar y comparar el extremo N-terminal de cada proteína de fusión (plasmidial y cromosomal).

Posteriormente, se trató de comprobar la secreción *in vitro* de estas fusiones plasmidiales, por lo que se realizaron ensayos para la inmunodetección de las proteínas de fusión a partir de sobrenadantes de cultivos bacterianos. Para este experimento, cada bacteria se creció en la condición inductora de la SPI-1 (para la detección de SipA-CyaA') o en la condición inductora de la SPI-2 (para la detección de SseF-CyaA' y SseG-CyaA'). A diferencia de la detección en lisados bacterianos, en este experimento se requiere la inducción de la expresión de ambas islas, ya que la bacteria requiere de los T3SS-1 y T3SS-2 para translocar los efectores al medio de cultivo. En este caso, sólo se logró detectar la fusión SipA-CyaA' en los sobrenadantes bacterianos. Para poder detectar la secreción de las fusiones SseF-CyaA' y SseG-CyaA' se aumentó el volumen de cultivo y se utilizaron técnicas de concentración de proteínas, como precipitación con TCA, las cuales no fueron suficientes para obtener cantidades detectables de cada proteína en los sobrenadantes de los cultivos. Por otra parte, es posible que estas proteínas de fusión no se hubieran

secretado debido a que el reportero alterase su estructura nativa, impidiendo su translocación por el T3SS-2, o que haya existido formación de cuerpos de inclusión.

Debido a que se observó la secreción *in vitro* de SipA-CyaA', se realizó un ensayo de translocación *in vivo* utilizando la cepa que expresa la fusión plasmidial SipA-CyaA' para infectar la línea celular HeLa y un sistema de cuantificación de cAMP basado en ELISA. Fue posible detectar una mayor concentración de cAMP en todos los tiempos de infección ensayados (1, 3 y 6 h post infección), con respecto a la concentración detectada en infecciones con la cepa silvestre, por lo que se deduce que la proteína de fusión SipA-CyaA' fue translocada al citoplasma de la célula hospedera. Se esperaba encontrar una mayor concentración de cAMP luego de 1 h post infección, dada la temporalidad de los fenotipos asociados al efector SipA, pero no en los tiempos 3 y 6 h post infección. Una posible explicación para este fenotipo es que la expresión de esta proteína de fusión esta bajo control de un promotor inducible por IPTG y no bajo el control fisiológico de la bacteria, por lo que la producción y secreción de la proteína de fusión se mantiene a lo largo del tiempo, no respondiendo a la temporalidad de los fenotipos asociados que se observa en la bacteria silvestre. Otra explicación posible es que el cAMP producido no sea degradado por la célula, manteniéndose una concentración elevada a lo largo del tiempo.

Una desventaja importante de utilizar fusiones plasmidiales es que la producción de la proteína de fusión no depende del promotor nativo de *Salmonella*, por lo que no es posible relacionar los resultados obtenidos con el ciclo fisiológico y de infección de la bacteria. Por esto, para evaluar la producción intracelular y la translocación de los efectores en estudio en función de la fisiología de la bacteria, se construyeron fusiones cromosomales de cada uno de ellos a CyaA'.

La producción *in vitro* de cada fusión cromosomal se comprobó mediante *Western blot*, observándose que las proteínas de fusión poseen una expresión dependiente de las condiciones inductoras de SPI-1 y SPI-2. En particular, la fusión SipA-CyaA' se expresa en condiciones inductoras de la SPI-1 y no en condiciones inductoras de la SPI-2, y las fusiones SseF-CyaA' y SseG-CyaA' se expresan en condiciones inductoras de la SPI-2, pero no en condiciones inductoras de la SPI-1. Ambas observaciones coinciden con lo esperado y confirman que las fusiones cromosomales responden a la regulación fisiológica de los genes correspondientes de la bacteria.

Posteriormente, se hicieron ensayos de infección en células HeLa para verificar si las proteínas de fusión se translocan a células eucariontes. De las tres construcciones probadas, sólo se obtuvo actividad enzimática con SipA-CyaA', la que mostró mayor concentración de cAMP a las 1, 3 y 6 h post infección en comparación con la cepa silvestre, repitiéndose el resultado obtenido en las infecciones realizadas con la cepa que presenta la fusión plasmidial SipA-CyaA'.

Por otra parte, las infecciones con cepas que expresan las fusiones cromosomales SseF-CyaA' y SseG-CyaA' no generaron aumentos en la concentración de cAMP en las células infectadas. Se esperaba a que estas fusiones sí presentaran actividad adenilato ciclasa, ya que su translocación ha sido demostrada previamente en ensayos *in vitro* (Hansen-Wester et al., 2002) y en infecciones de células HeLa (Deiwick et al., 2006; Müller et al., 2012). Una posible explicación a la falta de actividad enzimática de las fusiones SseF-CyaA' y SseG-CyaA' es que al presentar una fusión a una proteína de 43 kDa queden imposibilitadas de ser translocadas por el T3SS-2. Sin embargo, en estudios anteriores se ha utilizado un epítipo CyaA'-2HA para determinar la translocación de SseF (Miki et al., 2009). El peso molecular de este epítipo es de ~48 kDa, por lo que el tamaño de ~43 kDa del reportero CyaA' no debiese ser un impedimento para la translocación de SseF o SseG a través del T3SS-2. La falta de actividad adenilato ciclasa de las fusiones SseF-CyaA' y SseG-CyaA' también puede deberse a la estructura de la fusión generada, ya que se ha observado que esta actividad depende del dominio en el que se haga la fusión (Nagai et al., 2005). En el caso específico de esta tesis, el reportero CyaA' se fusionó en el extremo C-terminal de cada uno de los efectores en estudio, por lo que es posible que al construirse proteínas de fusión en el extremo N-terminal exista actividad adenilato ciclasa. Otra posibilidad es que, debido a que SseF y SseG son proteínas transmembranas (Yu et al., 2016), el dominio CyaA' quede oculto del citoplasma en la célula hospedera, por lo que no entraría en contacto con la calmodulina y, por consiguiente, las fusiones no serían activas. Sin embargo, se ha descrito que los extremos N-terminal y C-terminal de ambos efectores quedan expuestos al citoplasma (Salcedo & Holden, 2003; Abrahams et al., 2006; Müller et al., 2012; Yu et al., 2016).

Cabe mencionar que, en el protocolo utilizado, es necesario lisar las células infectadas. Estas células lisadas se sedimentan y se rescata el sobrenadante, al que se le realiza la medición de la concentración de cAMP. Es posible que esta sedimentación haya eliminado las proteínas SseF y SseG (debido a que se asocian a membranas), por lo que una

alternativa para poder encontrar actividad adenilato ciclasa es realizar la medición de cAMP en el sedimento. Alternativamente, para detectar la translocación de estas proteínas de fusión, sin depender de la actividad adenilato ciclasa, se podría realizar un fraccionamiento subcelular de las células infectadas y buscar la presencia de las correspondientes fusiones a CyaA' en la fracción de membranas, mediante *Western blot*.

Debido a que se observó que SipA-CyaA' se puede translocar en células HeLa, se realizaron ensayos de infección para determinar si los efectores en estudio son translocados en *D. discoideum*. Como primera aproximación, se realizó un ensayo de infección en placas de 24 pocillos, en el cual los valores de cAMP fueron muy bajos en comparación a los obtenidos en infecciones de células HeLa. Una posible explicación a eso es que la internalización de *S. Typhimurium* en *D. discoideum* es baja, por lo que se cambió a un ensayo de coincubación en el cual no se remueven las bacterias extracelulares. La elección de esta metodología se basa en que, en el momento de la infección, se pueden distinguir dos poblaciones bacterianas. Una población infecta a la célula, mientras que la otra expresa genes y secreta proteínas que asisten a la población infectiva (Segura et al., 2004), por lo que al mantener las bacterias en el medio extracelular podría observarse un aumento en la internalización bacteriana. Los resultados de estos ensayos fueron muy similares a los obtenidos con el protocolo anterior, no pudiéndose detectar actividad adenilato ciclasa. Si bien hasta la fecha no se han publicado trabajos donde se observe translocación de efectores de *Salmonella* en *D. discoideum*, sí se ha utilizado esta metodología para estudiar translocación de proteínas de *Legionella* en esta ameba (de Felipe et al., 2005), por lo que la metodología escogida sería válida.

Se ha observado que la expresión de genes de *Salmonella* es dependiente de la temperatura de crecimiento de la bacteria (Hurme et al., 1997). En esta tesis los ensayos de infección se realizaron a 22°C, temperatura óptima para el crecimiento de la ameba, por lo que la producción y secreción de los efectores en estudio pudo haberse visto alterada. Para evitar esto, previo a la infección cada cepa fue crecida durante toda la noche en sus respectivos medios de cultivo inductores, por lo que ya estaba "preparada" para infectar y translocar sus efectores. Por otra parte, una alternativa para poder detectar la translocación en *D. discoideum* de los efectores en estudio es repetir los ensayos de translocación utilizando las construcciones plasmidiales, suplementando continuamente el medio de infección con IPTG para sobreexpresar las fusiones. Otra alternativa es realizar

fraccionamientos subcelulares de amebas infectadas y buscar la presencia de las proteínas de fusión mediante *Western blot* en las distintas fracciones.

En conjunto, estos resultados indican que las proteínas de fusión a CyaA' se producen correctamente y que SipA-CyaA' se transloca a células HeLa, evidenciado por la concentración de cAMP producido. Sin embargo, mediante esta metodología no se pudo confirmar la translocación de los efectores en estudio al citoplasma de *D. discoideum*.

### **7.3. Los efectores SipA, SseF y SseG afectan la capacidad de *S. Typhimurium* de residir en una estructura vacuolar VatM<sup>+</sup> en *D. discoideum***

Los tres efectores con los que se trabajó en esta tesis están involucrados en controlar el posicionamiento intracelular de la SCV en diferentes modelos de infección (Brawn et al., 2007; Abrahms et al., 2006; Salcedo & Holden, 2003; Yu et al., 2016), por lo que se propuso determinar si cumplen una función similar en *D. discoideum*. Para esto, se utilizó la cepa silvestre y las mutantes  $\Delta sseF$ ,  $\Delta sseG$  y  $\Delta sseFG$ , todas ellas transformadas con el plasmidio pFCcGi (que permite la expresión constitutiva de mCherry) para infectar una cepa de *D. discoideum* que expresa una fusión de la ATPasa vacuolar VatM a GFP. Esta cepa de *D. discoideum* se construyó originalmente para estudiar la actividad del complejo contráctil vacuolar y el tráfico de la v-ATPasa en la vía endocítica de *D. discoideum* (Clarke et al., 2002). Posteriormente, esta fusión se utilizó para monitorear el tráfico de la v-ATPasa en la vía fagocítica de *D. discoideum* al ser infectada con levaduras (Clarke et al., 2010) y para observar estructuras vacuolares en infecciones con *Legionella pneumophila* (Lu & Clarke, 2005; Weber et al., 2006), *Mycobacterium marinum* (Kolonko et al., 2014) y *Klebsiella pneumoniae* (Marcoleta et al., 2018). Esta fusión también se ha utilizado en nuestro laboratorio para observar estructuras vacuolares en infecciones de la ameba con *S. Typhimurium* (Valenzuela et al., 2021).

Cada infección se observó en un microscopio confocal a distintos tiempos y se determinó el porcentaje de bacterias que residen dentro de estructuras vacuolares que presentan fluorescencia verde. Los resultados del análisis de las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal muestran que luego de 1 h post infección la fracción de bacterias intracelulares de la cepa  $\Delta sseFG$  en el interior de estas estructuras vacuolares es menor en comparación con la cepa silvestre. Considerando que los efectores SseF y SseG actúan en la etapa intermedia del desarrollo de la SCV (Steele-Mortimer et al., 2008), el resultado obtenido no concuerda con lo esperado. Una posible explicación es que los tiempos de

acción de cada efector en *D. discoideum* no coincidan con lo descrito en otros modelos de células eucariontes. Adicionalmente, en este tiempo la cepa  $\Delta$ sseFG no presenta defectos en su supervivencia intracelular, por lo que el hecho de tener defectos en la capacidad de residir en estructuras vacuolares no influiría en su supervivencia en esta ameba.

Por su parte, a las 3 h post infección las cepas  $\Delta$ sseF y  $\Delta$ sseG presentaron defectos en su capacidad de residir en estructuras vacuolares. Como se menciona en el párrafo anterior, los efectores SseF y SseG son importantes en la etapa intermedia del desarrollo de la SCV, por lo que lo observado coincide con lo descrito en células de mamífero (Deiwick et al., 2006). En este tiempo post infección la cepa  $\Delta$ sseF presenta defectos en su supervivencia intracelular, por lo que se podría concluir que la viabilidad de las mutantes estaría afectada por su menor asociación a una estructura vacuolar. Sin embargo, lo anterior no se observó en la cepa  $\Delta$ sseG. Una posible explicación para esto es que algún efector de la bacteria permita su supervivencia a pesar que ésta no se encuentre asociada a una estructura vacuolar. A las 6 h post infección, ninguna cepa presentó dificultades significativas para residir en estructuras vacuolares VatM<sup>+</sup>; sin embargo, los resultados presentaron una gran dispersión, por lo que podría observarse un fenotipo significativo al aumentar el número de réplicas del ensayo.

Cabe destacar que mediante esta metodología no es posible observar si la estructura vacuolar en la que reside *S. Typhimurium* tiene un correcto posicionamiento, proceso en el cual los efectores SseF y SseG están fuertemente involucrados (Abrahms et al., 2006; Salcedo & Holden, 2003), por lo que no es posible relacionar el defecto de residir dentro de una estructura vacuolar con el correcto posicionamiento de ésta. En células de mamífero, la SCV adquiere un posicionamiento perinuclear anclándose al aparato de Golgi (Yu et al., 2016), por lo que para estudiar el posicionamiento de la estructura presente en *D. discoideum* sería necesario infectar una cepa de la ameba que exprese algún marcador de Golgi (Schneider et al., 2000), o teñir el DNA de la ameba con DAPI. También es importante mencionar la posibilidad que las estructuras vacuolares marcadas no corresponden necesariamente a un nicho replicativo para la bacteria. De hecho, las estructuras vacuolares que se marcan en la ameba que expresa la fusión VatM-GFP no son exclusivamente SCV, sino que también pueden ser fagosomas y lisosomas, entre otras estructuras membranosas (Clarke et al., 2002; Marshansky & Futai, 2008).

Como se mencionó, existen diferencias entre los resultados obtenidos a partir de los ensayos de infección para determinar supervivencia intracelular y los ensayos de infección

para determinar si los efectores afectan la capacidad de la bacteria de residir en estructuras vacuolares. Sin embargo, estos resultados no son estrictamente comparables debido a las diferencias metodológicas de cada ensayo. Por una parte, las infecciones para determinar supervivencia intracelular se realizaron en un volumen de 10 mL que está en constante agitación, lo que permite que exista una mayor probabilidad de interacción entre las amebas y las bacterias. Por su parte, los ensayos de infección para análisis mediante microscopía confocal se realizaron en placas  $\mu$ -Slide de 8 pocillos utilizando un volumen de infección de 100  $\mu$ L por pocillo y sin agitación, por lo que existe una menor probabilidad de interacción entre ambos microorganismos. Aún más importante es el hecho que los ensayos usados para evaluar supervivencia intracelular son ensayos de competencia, donde las infecciones se realizan usando una mezcla 1:1 de la cepa en estudio y la cepa silvestre. Como se mencionó, la literatura muestra que luego del momento de la infección existen dos poblaciones de bacterias que presentan un comportamiento distinto. Una población se dedica a infectar las células, mientras que la otra secreta proteínas efectoras para asistir en la internalización de la población infectiva bacteriana (Segura et al., 2004). De esta forma, en presencia de la bacteria silvestre, ésta podría ayudar a la cepa mutante a infectar, por lo que existiría una mayor internalización y, por lo tanto, más bacterias intracelulares.

En esta tesis no se realizaron ensayos de complementación, por lo que para validar los fenotipos de las mutantes es necesario repetir los ensayos utilizando cepas mutantes complementadas en *trans*.

Cabe mencionar que los resultados obtenidos corresponden a una primera aproximación con respecto a la importancia de los 3 efectores en la interacción entre *S. Typhimurium* y *D. discoideum*. Entre las posibilidades para continuar este trabajo se destacan: confirmar si los efectores SseF y SseG contribuyen a la capacidad de la SCV de posicionarse de forma perinuclear dentro de la ameba; si SipA afecta la composición proteica y lipídica de la estructura vacuolar en la que reside la bacteria dentro de la ameba; o si los efectores en estudio son importantes para la formación de los SIFs.

En su conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis permiten concluir que los efectores SipA, SseF y SseG son importantes para la interacción entre *S. Typhimurium* y *D. discoideum*, afectando la capacidad de la bacteria de sobrevivir y de residir en compartimentos vacuolares dentro de la ameba.

## 8. CONCLUSIONES

- La proteína efectora SseF participa en el proceso de internalización de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*.
- Las proteínas efectoras SipA, SseF y SseG son requeridas para la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*.
- Mediante la generación de fusiones plasmidiales y cromosomales al reportero CyaA', se logró detectar la expresión y secreción de los efectores SipA, SseF y SseG, y la translocación del efector SipA en infecciones de células HeLa con *S. Typhimurium*.
- Mediante la generación de fusiones plasmidiales y cromosomales al reportero CyaA' no fue posible confirmar la expresión y translocación de los efectores SipA, SseF y SseG en infecciones de *D. discoideum* con *S. Typhimurium*.
- Las proteínas efectoras SseF y SseG participan en la localización intracelular de *S. Typhimurium* en un compartimento vacuolar VatM<sup>+</sup> de *D. discoideum*.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abrahams GL, Müller P, Hensel M. (2006). Functional dissection of SseF, a type III effector protein involved in positioning the *Salmonella*-containing vacuole. *Traffic* 7(8):950-965.
- Baisón-Olmo F, Galindo-Moreno M, Ramos-Morales F. (2015) Host cell type-dependent translocation and PhoP-mediated positive regulation of the effector SseK1 of *Salmonella enterica*. *Front Microbiol* 6:396.
- Barker J, Humphrey TJ, Brown MW. (1999). Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease. *FEMS Microbiol Lett* 173(2):291-295.
- Bleasdale B, Lott PJ, Jagannathan A, Stevens MP, Birtles RJ, Wigley P. (2009). The *Salmonella* pathogenicity island 2-encoded type III secretion system is essential for the survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in free-living amoebae. *Appl Environ Microbiol* 75(6):1793-1795.
- Bozzaro S, Eichinger L. (2011). The professional phagocyte *Dictyostelium discoideum* as a model host for bacterial pathogens. *Curr Drug Targets* 12(7):942-954.
- Brandl MT, Rosenthal BM, Haxo AF, Berk SG. (2005). Enhanced survival of *Salmonella enterica* in vesicles released by a soilborne *Tetrahymena* species. *Appl Environ Microbiol* 71(3):1562-1569.
- Brawn LC, Hayward RD, Koronakis V. (2007). *Salmonella* SPI1 effector SipA persists after entry and cooperates with a SPI2 effector to regulate phagosome maturation and intracellular replication. *Cell Host Microbe* 1(1):63-75.
- Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. (2000). *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol* 38(7):2465-2467.
- Bueno SM, Riquelme S, Riedel CA, Kalergis AM. (2012). Mechanisms used by virulent *Salmonella* to impair dendritic cell function and evade adaptive immunity. *Immunology* 137(1):28-36.
- Canals R, McClelland M, Santiviago CA, Andrews-Polymenis H. (2011). Genomics of *Salmonella* species. *En Genomics of Foodborne Bacterial Pathogens*. Zhang W and Wiedmann M (Editores), Springer New York, pp171-235.
- Cherepanov PP, Wackernagel W. (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc<sup>R</sup> and Km<sup>R</sup> cassettes with the option of FLP-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158(1):9-14.
- Cirillo JD, Cirillo SL, Yan L, Bermudez LE, Falkow S, Tompkins LS. (1999). Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 67(9):4427-4434.
- Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS, Bermudez LE. (1997). Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect Immun* 65(9):3759-3767.
- Clarke M, Köhler J, Arana Q, Liu T, Heuser J, Gerisch G. (2002). Dynamics of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in the contractile vacuole complex and the endosomal pathway of *Dictyostelium* cells. *J Cell Sci* 115(Pt 14):2893-905.

- Clarke M, Maddera L, Engel U, Gerisch G. (2010). Retrieval of the vacuolar H-ATPase from phagosomes revealed by live cell imaging. *PLoS One* 5(1):e8585.
- Coburn B, Grassl GA, Finlay BB. (2007). *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol Cell Biol* 85(2):112-118.
- Creasey EA, Isberg RR. (2014). Maintenance of vacuole integrity by bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol* 17:46-52.
- de Felipe KS, Pampou S, Jovanovic OS, Pericone CD, Ye SF, Kalachikov S, Shuman HA. (2005). Evidence for acquisition of *Legionella* type IV secretion substrates via interdomain horizontal gene transfer. *J Bacteriol* 187(22):7716-7726.
- Deiwick J, Salcedo SP, Boucrot E, Gilliland SM, Henry T, Petermann N, Waterman SR, Gorvel JP, Holden DW, Méresse S. (2006). The translocated *Salmonella* effector proteins SseF and SseG interact and are required to establish an intracellular replication niche. *Infect Immun* 74(12):6965-72.
- Desai PT, Porwollik S, Long F, Cheng P, Wollam A, Bhonagiri-Palsikar V, Hallsworth-Pepin K, Clifton SW, Weinstock GM, McClelland M. (2013). Evolutionary genomics of *Salmonella enterica* subspecies. *mBio* 4(2):e00579-12.
- Duhon D, Cardelli J. (2002). The regulation of phagosome maturation in *Dictyostelium*. *J Muscle Res Cell Motil* 23(7-8):803-808.
- Eichinger L. (2003). Revamp a model-status and prospects of the *Dictyostelium* genome project. *Curr Genet* 44(2):59-72.
- Essig A, Heinemann M, Simnacher U, Marre R. (1997). Infection of *Acanthamoeba castellanii* by *Chlamydia pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol* 63(4):1396-1399.
- Feng ZZ, Jiang AJ, Mao AW, Feng Y, Wang W, Li J, Zhang X, Xing K, Peng X. (2018). The *Salmonella* effectors SseF and SseG inhibit Rab1A-mediated autophagy to facilitate intracellular bacterial survival and replication. *J Biol Chem* 293(25):9662-9673.
- Fernández PA, Zabner M, Ortega J, Morgado C, Amaya F, Vera G, Rubilar C, Salas B, Cuevas V, Valenzuela C, Baisón-Olmo F, Álvarez SA, Santiviago CA. (2021). Novel template plasmids pCyaA'-Kan and pCyaA'-Cam for generation of unmarked chromosomal *cyaA'* translational fusion to T3SS effectors in *Salmonella*. *Microorganisms* 9(3):475.
- Figueira R, Watson KG, Holden DW, Helaine S. (2013). Identification of *Salmonella* pathogenicity island-2 type III secretion system effectors involved in intramacrophage replication of *S. enterica* serovar Typhimurium: implications for rational vaccine design. *mBio* 4(2):e00065.
- Frederiksen RF, Leisner JJ. (2015). Effects of *Listeria monocytogenes* EGD-e and *Salmonella enterica* ser. Typhimurium LT2 chitinases on intracellular survival in *Dictyostelium discoideum* and mammalian cell lines. *FEMS Microbiol Lett* 362(10):fzv067.
- Gaze WH, Burroughs N, Gallagher MP, Wellington EM. (2003). Interactions between *Salmonella typhimurium* and *Acanthamoeba polyphaga*, and observation of a new mode of intracellular growth within contractile vacuoles. *Microb Ecol* 46(3):358-369.

- Geddes K, Worley M, Niemann G, Heffron F. (2005). Identification of new secreted effectors in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* 73(10):6260-6271.
- Gourabathini P, Brandl MT, Redding KS, Gunderson JH, Berk SG. (2008). Interactions between food-borne pathogens and protozoa isolated from lettuce and spinach. *Appl Environ Microbiol* 74(8):2518-2525.
- Guy RL, Gonias LA, Stein MA. (2000). Aggregation of host endosomes by *Salmonella* requires SPI2 translocation of SseFG and involves SpvR and the *fms-aroE* intragenic region. *Mol Microbiol* 37(6):1417-1435.
- Hansen-Wester I, Stecher B, Hensel M. (2002). Type III secretion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium translocated effectors and SseFG. *Infect Immun* 70(3):1403-1409.
- Haraga A, Ohlson MB, Miller SI. (2008). Salmonellae interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol* 6(1):53-66.
- Hurme R, Berndt KD, Normark SJ, Rhen M. (1997). A proteinaceous gene regulatory thermometer in *Salmonella*. *Cell* 90(1):55-64.
- Jarvik T, Smillie C, Groisman EA, Ochman H. (2010). Short-term signatures of evolutionary change in the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028 genome. *J Bacteriol* 192(2):560-567.
- Jia K, Thomas C, Akbar M, Sun Q, Adams-Huet B, Gilpin C, Levine B. (2009). Autophagy genes protect against *Salmonella typhimurium* infection and mediate insulin signaling-regulated pathogen resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(34):14564-14569.
- Knodler LA, Steele-Mortimer O. (2003). Taking possession: biogenesis of the *Salmonella*-containing vacuole. *Traffic* 4(9):587-599.
- Kolonko M, Geffken AC, Blumer T, Hagens K, Schaible UE, Hagedorn M. (2014). WASH-driven actin polymerization is required for efficient mycobacterial phagosome maturation arrest. *Cell Microbiol* (2):232-246.
- Kuhle V, Hensel M. (2002). SseF and SseG are translocated effectors of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 that modulate aggregation of endosomal compartments. *Cell Microbiol* 4(12):813-824.
- Lu H, Clarke M. (2005). Dynamic properties of *Legionella*-containing phagosomes in *Dictyostelium* amoebae. *Cell Microbiol* 7(7):995-1007.
- Malik-Kale P, Jolly CE, Lathrop S, Winfree S, Luterbach C, Steele-Mortimer O. (2011). *Salmonella* - at home in the host cell. *Front Microbiol* 2:125.
- Maloy SR. (1990). *Experimental Techniques in Bacterial Genetics*. Jones & Bartlett, Boston.
- Marcoleta AE, Varas MA, Ortiz-Severín J, Vásquez L, Berríos-Pastén C, Sabag AV, Chávez FP, Allende ML, Santiviago CA, Monasterio O, Lagos R. (2018). Evaluating different virulence traits of *Klebsiella pneumoniae* using *Dictyostelium discoideum* and zebrafish larvae as host models. *Front Cell Infect Microbiol* 8:30.
- Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB. (2000). *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect* 2(2):145-156.

- Marolda CL, Hauröder B, John MA, Michel R, Valvano MA. (1999). Intracellular survival and saprophytic growth of isolates from the *Burkholderia cepacia* complex in free-living amoebae. *Microbiology* 145(7):1509-1517.
- Marshansky V, Futai M. (2008). The V-type H<sup>+</sup>-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. *Curr Opin Cell Biol* 20(4):415-426.
- McGhie EJ, Hayward RD, Koronakis V. (2001). Cooperation between actin-binding proteins of invasive *Salmonella*: SipA potentiates SipC nucleation and bundling of actin. *EMBO J* 20(9):2131-2139.
- McIntosh A, Meikle LM, Ormsby MJ, McCormick BA, Christie JM, Brewer JM, Roberts M, Wall DM. (2017). SipA activation of caspase-3 is a decisive mediator of host cell survival at early stages of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* 85(9):e00393-17.
- Miao EA, Miller SI. (2000). A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* (13):7539-7544.
- Miki T, Shibagaki Y, Danbara H, Okada N. (2009). Functional characterization of SsaE, a novel chaperone protein of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *J Bacteriol.* 191(22):6843-54.
- Mizusaki H, Takaya A, Yamamoto T, Aizawa S. (2008). Signal pathway in salt-activated expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 190(13):4624-4631.
- Müller P, Chikkaballi D, Hensel M. (2012). Functional dissection of SseF, a membrane-integral effector protein of intracellular *Salmonella enterica*. *PLoS One* 7(4):e35004.
- Nagai H, Cambronne ED, Kagan JC, Amor JC, Kahn RA, Roy CR. (2005) A C-terminal translocation signal required for Dot/Icm-dependent delivery of the *Legionella* RalF protein to host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(3):826-831.
- Nasser W, Santhanam B, Miranda ER, Parikh A, Juneja K, Rot G, Dinh C, Chen R, Zupan B, Shaulsky G, Kuspa A. (2013). Bacterial discrimination by dictyostelid amoebae reveals the complexity of ancient interspecies interactions. *Curr Biol* 23(10):862-872.
- Nelson DL, Kennedy EP. (1971) Magnesium transport in *Escherichia coli*. Inhibition by cobaltous ion. *J Biol Chem.* 246(9):3042-3049.
- Ramos-Morales F. (2012). Impact of *Salmonella enterica* type III secretion system effectors on the eukaryotic host cell. *ISRN Cell Biology* 2012:787934.
- Rashidi G, Ostrowski EA. (2019). Phagocyte chase behaviours: discrimination between Gram-negative and Gram-positive bacteria by amoebae. *Biol Lett* 15(1):20180607.
- Rehfuss MY, Parker CT, Brandl MT. (2011). *Salmonella* transcriptional signature in *Tetrahymena* phagosomes and role of acid tolerance in passage through the protist. *ISME J* 5(2):262-273.
- Riquelme S, Varas M, Valenzuela C, Velozo P, Chahin N, Aguilera P, Sabag A, Labra B, Álvarez SA, Chávez FP, Santiviago CA. (2016). Relevant genes linked to virulence are required for *Salmonella* Typhimurium to survive intracellularly in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Front Microbiol* 7:1305.

- Rowbotham TJ. (1980). Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. J Clin Pathol 33(12):1179-1183.
- Salcedo SP, Holden DW. (2003). SseG, a virulence protein that targets *Salmonella* to the Golgi network. EMBO J 22(19):5003-14.
- Santiviago CA, Reynolds MM, Porwollik S, Choi SH, Long F, Andrews-Polymenis HL, 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.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat Methods 28;9(7):676-82.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat Methods. (7):671-5.
- Schneider N, Schwartz JM, Köhler J, Becker M, Schwarz H, Gerisch G. (2000). Golvesin-GFP fusions as distinct markers for Golgi and post-Golgi vesicles in *Dictyostelium* cells. Biol Cell 92(7):495-511.
- Sebkova A, Karasova D, Crhanova M, Budinska E, Rychlik I. (2008). *aro* mutations in *Salmonella enterica* cause defects in cell wall and outer membrane integrity. J Bacteriol 190(9):3155-3160.
- Segal G, Shuman HA. (1999). *Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages. Infect Immun 67(5):2117-2124.
- Segura I, Casadesús J, Ramos-Morales F. (2004). Use of mixed infections to study cell invasion and intracellular proliferation of *Salmonella enterica* in eukaryotic cell cultures. J Microbiol Methods 56(1):83-91.
- Sillo A, Matthias J, Konertz R, Bozzaro S, Eichinger L. (2011). *Salmonella typhimurium* is pathogenic for *Dictyostelium* cells and subverts the starvation response. Cell Microbiol 13(11):1793-1811.
- Singh PK, Kapoor A, Lomash RM, Kumar K, Kamerkar SC, Pucadyil TJ, Mukhopadhyay A. (2018). *Salmonella* SipA mimics a cognate SNARE for host Syntaxin8 to promote fusion with early endosomes. J Cell Biol 217(12):4199-4214.
- Skriwan C, Fajardo M, Hägele S, Horn M, Wagner M, Michel R, Krohne G, Schleicher M, Hacker J, Steinert M. (2002). Various bacterial pathogens and symbionts infect the amoeba *Dictyostelium discoideum*. Int J Med Microbiol 291(8):615-624.
- Sory MP, Boland A, Lambermont I, Cornelis GR. (1995). Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. Proc Natl Acad Sci U S A 92(26):11998-12002.
- Steele-Mortimer O. (2008) The *Salmonella*-containing vacuole: moving with the times. Curr Opin Microbiol 11(1):38-45.

- Stein MA, Leung KY, Zwick M, Garcia-del Portillo F, Finlay BB. (1996). Identification of a *Salmonella* virulence gene required for formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins within epithelial cells. *Mol Microbiol* 20(1):151-164.
- Steinert M. (2011). Pathogen-host interactions in *Dictyostelium*, *Legionella*, *Mycobacterium* and other pathogens. *Semin Cell Dev Biol* 22(1):70-76.
- Terebiznik MR, Vieira OV, Marcus SL, Slade A, Yip CM, Trimble WS, Meyer T, Finlay BB, Grinstein S. (2002). Elimination of host cell PtdIns(4,5)P(2) by bacterial SigD promotes membrane fission during invasion by *Salmonella*. *Nat Cell Biol* 4(10):766-773.
- Tezcan-Merdol D, Ljungström M, Winiecka-Krusnell J, Linder E, Engstrand L, Rhen M. (2004). Uptake and replication of *Salmonella enterica* in *Acanthamoeba rhysodes*. *Appl Environ Microbiol* 70(6):3706-3714.
- Uzzau S, Figueroa-Bossi N, Rubino S, Bossi L. (2001). Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(26):15264-15269.
- Valenzuela C, Gil M, Urrutia ÍM, Sabag A, Enninga J, Santiviago CA. (2021). SopB- and SifA-dependent shaping of the *Salmonella*-containing vacuole proteome in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Cell Microbiol* 23(1):e13263.
- van der Heijden J, Finlay BB. (2012). Type III effector-mediated processes in *Salmonella* infection. *Future Microbiol* 7(6):685-703.
- Weber SS, Ragaz C, Reus K, Nyfeler Y, Hilbi H. (2006). *Legionella pneumophila* exploits PI(4)P to anchor secreted effector proteins to the replicative vacuole. *PLoS Pathog* 2(5):e46.
- Wildschutte H, Lawrence JG. (2007). Differential *Salmonella* survival against communities of intestinal amoebae. *Microbiology* 153(Pt 6):1781-1789.
- Yu XJ, Liu M, Holden DW. (2016). *Salmonella* effectors SseF and SseG interact with mammalian protein ACBD3 (GCP60) to anchor *Salmonella*-containing vacuoles at the Golgi network. *mBio* 7(4):e00474-16.
- Zhou D, Mooseker MS, Galán JE. (1999). Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science* 283(5410):2092-2095.