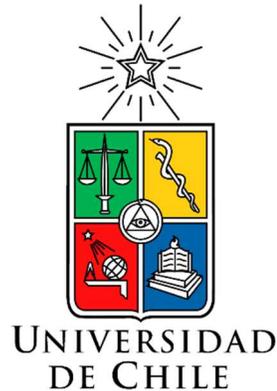


ESCUELA DE POSTGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



“Participación de los efectores GtgE y SopD2 de *Salmonella* Typhimurium en la inhibición del reclutamiento de Rab32A hacia la vacuola contenedora de *Salmonella* en *Dictyostelium discoideum* y su contribución a la supervivencia intracelular y virulencia bacteriana”

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Microbiología

Fernando Andrés Amaya Inzunza

Agosto, 2024

Director de tesis: **Dr. Carlos A. Santiviago**

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

Fernando Andrés Amaya Inzunza

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día:

Director de Tesis:

Dr. Carlos A. Santiviago

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Mario Tello

Dr. Roberto Vidal

Dr. Felipe Arenas

*“Dios es causa y efecto, es efecto y causa.
El hombre es sólo efecto de una causa que no entiende.”*
– **Mano Negra**

Esta tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Microbiología, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, bajo la supervisión del Dr. Carlos A. Santiviago Cid.

Esta tesis fue financiada por los Proyectos FONDECYT 1171844 y 1212075, así como por la Beca CONICYT/ANID para Doctorado Nacional 21191925

BIOGRAFÍA



Siempre he sentido un enorme interés por comprender como funcionan los procesos biológicos asociados a los organismos vivos. Esto me motivó a estudiar Bioquímica en la Universidad de Chile, carrera de la cual me titulé en 2018 junto a la obtención concomitante del grado de Magíster en Bioquímica. Desde la primera cátedra del curso de Microbiología en pregrado, tuve la certeza de que deseaba investigar a los microorganismos, particularmente la interacción que establecen los patógenos con sus respectivos hospederos. Esa convicción me impulsó a ingresar en el año 2013 como estudiante al Laboratorio de Microbiología, donde he desarrollado gran parte de mi formación científica bajo la mentoría del Dr. Sergio A. Álvarez y el Dr. Carlos A. Santiviago, quién ha sido mi guía y director de tesis desde el año 2018 en el Doctorado en Ciencias con mención en Microbiología de la Universidad de Chile.

1.- AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia, porque sin ellos esto ni nada de lo poco que he hecho en mi vida habría sido posible. A mi mamá, “La Gordis”, por su cariño verdaderamente incondicional que pese a no ser muy verbal nuestra relación, sólo me basta estar cerca de ella para sentir su calidez. A mi hermana, “La Poly”, mi segunda mamá cuando fui pequeño, quién me cuida y quiere como si realmente fuera su hijo. A mi hermano mayor, con quien siempre tengo espacio para conversar, y quien es el mejor y más ameno relator de historias que conozco. A Rolando, mi cuñado, por su voluntad de oro para ayudar en todo. Agradezco a mi papá quien ya no me puede acompañar, pero cuyas enseñanzas siempre mantendré conmigo, pues de él aprendí lo que de nadie más podría haber aprendido. Agradezco a Lucky por ser tan cariñoso y recibirme con tanta efusividad cada vez que vuelvo a casa, y agradezco a Mao por espiarme y darle alegría a mi hermana.

Agradezco a Bego por ayudarme a ser más flexible, por lo mucho que aprendí de mí a su lado, por siempre instarme a vivir más allá de las responsabilidades y por acompañarme en un momento particularmente difícil para mí. Agradezco a Tere por arriesgarse conmigo y por ser una compañera inolvidable en las pocas aventuras de las muchas que queríamos vivir juntos. Agradezco a Dani por haber complementado mis propuestas alocadas con sus ideas aún más temerarias.

Agradezco a la comisión académica constituida por el Dr. Mario Tello, el Dr. Roberto Vidal y el Dr. Felipe Arenas, quienes aportaron valiosas observaciones y sugerencias, siempre desde una perspectiva constructiva. En toda instancia, fue un agrado presentarles y discutir con ellos mi trabajo.

Agradezco a los coordinadores del Programa de Doctorado Conjunto en Microbiología, la Dra. Jennifer Alcaíno y el Dr. Mario Tello, quienes constantemente se preocuparon de mi situación académica como estudiante, pero sin desatender nunca mi bienestar como persona, siendo pacientes y comprensivos para conmigo. Agradezco a Ximena y a Claudia, secretarías del programa, quienes con mucha gentileza y absoluta diligencia siempre me ayudaron con todas las gestiones y requerimientos administrativos.

Agradezco a los directores del Laboratorio de Microbiología, el Dr. Carlos Santiviago y el Dr. Sergio Álvarez, mis profes, mis tutores, mis jefes y amigos. A ellos les adeudo en gran medida mi pasión por la Microbiología, al introducirme a esta maravillosa ciencia de una forma tan entusiasta que reforzó y potenció mi interés. En esta oportunidad, el Dr. Álvarez no fue oficialmente mi tutor, pero sí lo fue en ejercicio, estando siempre disponible para ayudar y para discutir experimentos y resultados, así como para conversar sobre la vida como el amigo que es para mí. El Dr. Santiviago fue por segunda vez mi tutor de tesis, el mejor que cualquier estudiante podría tener, pues me respalda y ayuda ante todas las situaciones que se presentan, siempre procurando mi máximo desarrollo científico, pero manteniendo preocupación hacia mi bienestar personal como siento que lo hace un hermano mayor.

Agradezco a don Luis, nuestro “Lindo Precioso”, por las conversaciones matutinas, por su voluntad de ayudar en cualquier petición y por sus palabras de aliento para recobrar confianza y seguir avanzando.

Agradezco a la Sra. Xime por su calidez, amabilidad y eficiencia para ayudarme en cada ocasión que se lo solicité.

Agradezco los antiguos miembros del Laboratorio de Microbiología, con quienes siempre estaré unido por la amistad. Agradezco a Marce por ser una amiga tan alegre, excelente público para reírse de bromas fomes y por presentarme el elixir de Fanta con helado de lúcuma. Agradezco a Kamo por ser una amiga que, con cariño y sus enormes capacidades científicas, siempre resolvía los problemas y apagaba los “incendios” en el laboratorio. Agradezco a Pali por ser una persona con una calidad humana a la que todos deberíamos aspirar, además de una científica muy responsable y comprometida, así como una amiga de gran sabiduría que siempre se preocupa por los demás. Agradezco a Pipe, mi “Perreomaestro”, un amigo que siempre tiene por ahí una reflexión bajo la manga, junto con ideas atípicas y la motivación para discutir las; orgulloso estoy de ser su “padawan”. Agradezco a Bea por ser una amiga que, sin dejar de lado las bromas, aporta sobriedad y mesura, siendo también mi “abogada” y la mejor defensora que uno podría tener. Agradezco a Héctor por ser un “gato” mañoso con quien siempre se puede pelear y un amigo malvado de “cartón” que en realidad es bonachón. Agradezco a Morgan por ser una amiga que sólo con su presencia ya brinda compañía, sumado a sus interesantes conversaciones esotéricas y las sesiones de trabajo musicalizadas con *Vengaboys*. Agradezco a Gabriel, “El Negro”, un amigo que siempre tiene una sonrisa y con quien es imposible no conversar, así como terminar riendo de las bromas más fomes que puedan existir. Agradezco a Grillo por su alegría cada vez que lo veo y por las muchas salidas en bicicleta. Agradezco a Fernando por su estadía en el laboratorio y su aporte en el trabajo experimental.

Agradezco a Javi, Jesu, Gabi y Fran por su gran compromiso y desempeño, así como por la oportunidad de tutelar su trabajo en el laboratorio. También agradezco a “Caro 1” por los calcetines divertidos y a “Caro 8” por ser la “*Top One*”. Agradezco a Cata por su contribución en las labores del laboratorio como “tesista no tesista” y hermana perdida de Chinchi, por sus comentarios y referencias chistosas, por sus datos de deportes y por sus recomendaciones culinarias y de coctelería.

Agradezco a Chinchi por ser una amiga incondicional con quien las risas siempre abundan, por mostrarme como vivir con el asombro a flor de piel y por ser la persona que querría a mi lado si el mundo se volviera en mi contra.

Agradezco a Andrea y a mi compadre JP, mis “*Bro-Force*”. A Andrea le agradezco por ser una gran amiga cuyas palabras y acciones de aliento y cariño tengo la certeza de que siempre están ahí. A JP por su generosidad, entusiasmo y apoyo, por ser mi inseparable compañero de ruta en moto y por ser la persona con mayor motivación que conozco, tanto que sólo estando cerca uno se anima. Gracias a ambos por el privilegio de ser su amigo.

Agradezco a Bayron, un amigo entrañable que está ahí siempre, apoyándome en mis decisiones aunque él no las comparta y acompañándome cuando vuelvo después de haberme equivocado.

Agradezco a Ítalo, un ejemplo para mí como científico y un amigo increíble con quien siempre reírse de las cosas más fomes y absurdas, y quien siempre se acerca para apoyar y aconsejar con sabiduría en las instancias complejas.

Agradezco a Jimmy, “El Choro”, un amigo con quien tengo una cercanía difícil de definir en palabras y con quien es un agrado conversar, especialmente de temas ñoños y de otros no tanto, como música, cervezas y comida. El mejor asesor tecnológico y experto culinario.

Agradezco a Cami, “Zorro 12”, una amiga con quien las palabras no son necesarias para sentir su apoyo y que está justo ahí para intervenir y reforzar la motivación en uno mismo. Siempre con todo el entusiasmo para organizar y concretar actividades con los amigos. Le agradezco a ella y a Gonza por haber sido partícipe de la propuesta y celebración de su matrimonio, así como por mi adorno de tanque hecho de un tanque real.

Agradezco a Aballai, “El Washo” y ahora “Perkin” o “El Estado”, un amigo de la vida con quien nos entendemos y somos más similares de lo que nunca pensamos. Un ejemplo para mí de cómo vivir sin desperdiciar el tiempo ni las oportunidades, además de una fuente inagotable de risas, anécdotas chistosas y siempre mi “pareja” no oficial para subir cerros, ir al cine, etc.

Agradezco a todo “*Blondel’s Lab*” por haberme recibido como uno de sus miembros durante un tiempo y por nunca dejar de tratarme como tal, sintiéndome como en casa cada vez que los visito. Agradezco a Blondel, un científico extraordinario y un magnífico tutor, quién desde siempre me ha brindado el mayor de los apoyos y las mejores oportunidades que podría imaginar, sin descuidar mi bienestar personal. Agradezco a Seba por ser un amigo siempre disponible para ayudar y por su capacidad de ser graciosamente incorrecto como nadie más podría; también por ser ese compadre que me dio el impulso final y las orientaciones iniciales para involucrarme de lleno en el mundo de las motos, así que le debo mucho. Agradezco a Nico por tener siempre una actitud positiva y ser un amigo que fomenta a que uno vea las “desgracias” la vida de una forma más alegre, así como también por avivar las bromas y ofrecerse de anfitrión reiteradamente aun conociendo los “riesgos” de recibirnos. Agradezco a Vero por su conocimiento, experiencia y experticia científica, así como por su jovialidad, risas e historias entretenidas. Agradezco a Pablo por su simpatía y amabilidad cuando visito el laboratorio.

Agradezco a David, “Deivid” y “El Comandante” de la “Brigada T6SS”, un excelente científico, muy dedicado y con mucho su entusiasmo tanto para trabajar y colaborar en actividades de investigación, como para bromear, compartir y celebrar entre amigos. Muy agradecido estoy de conocerlo y de haber sido invitado a participar de la “Brigada”.

Agradezco a Feli por ser un amigo tan simpático y con una personalidad tan ligera, con quien la conversación siempre fluye naturalmente; también por haber unificado y ser el punto de encuentro de muchos laboratorios, permitiéndonos conocer y establecer amistad con personas maravillosas. Agradezco a Dani, por ser una amiga tan afectuosa en su interacción con otros y aguerrida en su carácter, lo cual hace que siempre sean interesantes y chistosas las conversaciones. Ella es para mí como siempre digo, la versión ruda de Chinchi.

Agradezco a mis compañeros del doctorado, con quienes afortunadamente para mí fuimos amigos desde un comienzo, formando un equipo para enfrentar las exigencias académicas del doc y vivir todas las aventuras que pudimos en nuestros tiempos libres. Agradezco a Rodrigo, mi compadre de piscolas y conversaciones profundas sobre Política, Filosofía, Epistemología, Biología, Evolución, etc. Agradezco a Yaz, “La Capitana”, una amiga que siempre fue la líder y un pilar para el grupo, organizada y trabajadora como nadie, sin dejar de ser afectuosa con todos sus cercanos. Agradezco a Aarón, un amigo muy ingenioso y con un humor negro muy particular, con el cual compatibilizo muy bien y nos permite reírnos de los aspectos absurdos que identificamos en todo. Agradezco a Mauro, un amigo con quien siempre nos apoyamos en todo lo que tengamos dudas y necesitemos ayuda, somos nuestros respectivos comodines telefónicos y él es con quien siempre surge una risa fácil de las ridiculeces de la vida que nosotros mismos exacerbamos o nos inventamos.

Agradezco a todo el equipo de Pewman *Innovation*. Agradezco a Jota y a la Profe Denisse por su confianza y la oportunidad de incursionar en el mundo de la Biotecnología integrándome en la empresa que fundaron. Agradezco a Enzo por su liderazgo cordial, por sus datos *freak* y por ser el *DJ* oficial. Agradezco a Diego por sus enseñanzas financieras, por su enorme voluntad para ayudar y por su interés de aprender. Agradezco a Alberto por enseñarme de Agronomía, por su actitud bromista y por todo el ánimo que siempre brinda a los demás. Agradezco a Catalina por recibirme en el laboratorio, por su inducción y por los relatos paranormales mientras trabajábamos. Afortunado me siento de haberme convertido en amigo de todos. Agradezco también la dedicación y simpatía de Seba, Javier, Ignacio y Paulo, practicantes a quienes tuve el honor de supervisar.

Agradezco a todos los miembros del “*Nano Lab*” por siempre recibirme con la mejor de las disposiciones cuando acudía a realizar experimentos. Agradezco a Felipe, a Mati, a Nico, a Cocolo, a Juan, a Javiera, a Claudio y a todos por su ayuda e invaluable hospitalidad.

Agradezco profundamente a todas las personas que muy probablemente he olvidado mencionar aquí, con quienes me disculpo por no resaltarlas como cada una merece, pero que les puedo asegurar que han contribuido a este trabajo y a mi vida mucho más de lo que podrían intuir.

¡Muchas gracias por todo!

2.- ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.	AGRADECIMIENTOS	VI
2.	ÍNDICE DE CONTENIDOS	X
3.	ÍNDICE DE TABLAS	XIII
4.	ÍNDICE DE FIGURAS	XIV
5.	ABREVIATURAS	XVI
6.	ABSTRACT	XVIII
7.	RESUMEN	XXI
8.	INTRODUCCIÓN	1
8.1	Generalidades sobre el género <i>Salmonella</i>	1
8.2	Ciclo infeccioso de <i>Salmonella</i>	2
8.3	Mecanismo de patogenicidad y factores de virulencia de <i>Salmonella</i>	3
8.4	Alteración del tráfico vesicular en la ruta endo-lisosomal por <i>Salmonella</i>	4
8.5	Participación de los efectores GtgE y SopD2 en la supervivencia intracelular de <i>Salmonella</i>	7
8.6	Interacción de <i>Salmonella</i> con protozoos	10
8.7	<i>Dictyostelium discoideum</i> como organismo modelo	12
8.8	Rab32 cómo blanco celular durante la infección por <i>Salmonella</i> en <i>Dictyostelium discoideum</i>	14
9.	HIPÓTESIS & OBJETIVOS	16
9.1	Hipótesis	16
9.2	Objetivo general	16
9.3	Objetivos específicos.....	16
9.3.1	Objetivo específico I	16
9.3.2	Objetivo específico II	17
9.3.3	Objetivo específico III	17
10.	MATERIALES & MÉTODOS	18
10.1	Cepas bacterianas	18
10.2	Plasmidios.....	19
10.3	Partidores.....	21
10.4	Medios y condiciones de cultivo bacteriano.....	22
10.5	Líneas celulares eucariontes	22

10.6	Medios y condiciones de cultivo celular eucariontes.....	23
10.7	Extracción de DNA genómico bacteriano.....	24
10.8	Extracción de DNA plasmidial.....	24
10.9	Generación de mutantes de <i>S. Typhimurium</i> por el método <i>Red-swap</i>	25
10.9.1	Obtención de productos PCR para mutagénesis.....	25
10.9.2	Preparación de bacterias electrocompetentes y transformación bacteriana ..	26
10.9.3	Mutagénesis por intercambio alélico de productos PCR.....	27
10.9.4	Comprobación de las colonias mutantes por PCR.....	28
10.10	Transducción de alelos mutantes en <i>S. Typhimurium</i>	29
10.10.1	Preparación del lisado de partículas transductantes	29
10.10.2	Transducción	30
10.10.3	Comprobación y selección de transductantes	31
10.11	Construcción de la mutante doble Δ <i>gtgE</i> Δ <i>sopD2</i> de <i>S. Typhimurium</i>	31
10.12	Complementación en <i>trans</i> de las mutantes Δ <i>gtgE</i> y Δ <i>sopD2</i> de <i>S. Typhimurium</i>	33
10.13	Ensayo de internalización y supervivencia intracelular en <i>Dictyostelium discoideum</i>	35
10.13.1	Infeción de <i>D. discoideum</i> con <i>S. Typhimurium</i>	36
10.13.2	Internalización relativa, índice de competencia, análisis estadístico y expresión de resultados	38
10.14	Ensayos de retardo del ciclo de desarrollo social de <i>D. discoideum</i>	39
10.15	Distribución subcelular de la proteína Rab32A en <i>D. discoideum</i>	43
10.15.1	Generación de la proteína Rab32A fusionada en su extremo C-terminal al reportero GFP	43
10.15.2	Generación de la proteína Rab32A fusionada en su extremo N-terminal al reportero GFP	46
10.15.3	Transformación de <i>D. discoideum</i> con DNA plasmidial	47
10.15.4	Generación de cepas bacterianas fluorescentes.....	49
10.15.5	Ensayo de infección analizado mediante microscopía confocal	49
10.16	Actividad proteolítica del efector GtgE de <i>S. Typhimurium</i> sobre la proteína Rab32A de <i>D. discoideum</i>	52
10.16.1	Generación de las construcciones plasmidiales para la co-expresión de la proteína Rab32A y el efector GtgE.....	53
10.16.2	Co-expresión heteróloga de la proteína de fusión Rab32A-6xHis y del efector GtgE en una cepa recombinante de <i>E. coli</i>	57
10.16.3	Inmunodetección de la proteólisis de Rab32A-6xHis en lisados bacterianos totales.....	58

10.17	Análisis de plasmidios recombinantes mediante secuenciación	60
10.18	Análisis bioinformáticos basados en secuencia	60
11.	RESULTADOS	62
11.1	Las proteínas Rab32 de <i>D. discoideum</i> comparten una alta similitud de secuencia y residuos clave con proteínas Rab32 de mamífero	62
11.2	Los efectores GtgE y SopD2 contribuyen a la supervivencia intracelular y virulencias de <i>S. Typhimurium</i> en <i>D. discoideum</i>	65
11.3	Distribución subcelular de la proteína Rab32A en <i>D. discoideum</i> infectado con <i>S. Typhimurium</i>	72
11.4	El efector GtgE de <i>S. Typhimurium</i> tiene actividad proteolítica contra la proteína Rab32A de <i>D. discoideum</i>	77
12.	DISCUSIÓN	81
12.1	Participación de los efectores GtgE y SopD2 de <i>S. Typhimurium</i> en la interacción con la ameba <i>D. discoideum</i> en un contexto de infección	81
12.2	Proteínas Rab32 de <i>D. discoideum</i> como blancos celulares de la actividad catalítica de los efectores GtgE y SopD2 de <i>S. Typhimurium</i>	84
12.3	Distribución subcelular de la proteína Rab32A en <i>D. discoideum</i> y su comportamiento en respuesta a la infección por <i>S. Typhimurium</i>	86
12.4	Infección de <i>D. discoideum</i> por <i>S. Typhimurium</i> : participación de la GTPasa Rab32A de la ameba y contribución de los efectores bacterianos GtgE y SopD2	88
13	PROYECCIONES & PERSPECTIVAS	90
14	CONCLUSIONES	91
15	REFERENCIAS.....	92
16	ANEXOS	101
16.1	Proteínas de fusión de los efectores GtgE y SopD2 con el reportero CyaA'	101
16.2	Identificación de nuevos módulos efector/proteína inmunidad de los sistemas de secreción de tipo VI de <i>Salmonella</i> Dublin que contribuyen en la competencia interbacteriana.....	103
17	PREMIOS, PUBLICACIONES, PRESENTACIONES & OTROS	106
17.1	Becas y premios.....	106
17.2	Publicaciones científicas	106
17.3	Presentaciones en congresos científicos.....	107
17.4	Participación en actividades académicas y de docencia.....	109
17.5	Participación en actividades de extensión y vinculación con el medio	111

3.- ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 – Cepas bacterianas	18
Tabla 2 – Listado de plasmidios	20
Tabla 3 – Oligonucleótidos utilizados para PCR y mutagénesis	21
Tabla 4 – Linajes celulares de <i>D. discoideum</i>	23

4.- ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Salmonella</i> subvierte el sistema endo-lisosomal en células eucariontes.....	6
Figura 2 – Comportamiento intracelular de <i>Salmonella</i> Typhimurium en <i>Dictyostelium discoideum</i>	14
Figura 3 – Ensayos de internalización y supervivencia intracelular de <i>S. Typhimurium</i> en <i>D. discoideum</i>	36
Figura 4 – Ensayo de retardo del ciclo de desarrollo social de <i>D. discoideum</i>	41
Figura 5 – Ensayo de infección de <i>S. Typhimurium</i> en <i>D. discoideum</i> monitoreado mediante microscopía confocal.....	50
Figura 6 – Ensayo para evaluar la actividad proteolítica del efector GtgE de <i>S. Typhimurium</i> sobre la proteína Ra32A de <i>D. discoideum</i>	53
Figura 7 – Alineamiento de la secuencia aminoacídica de las proteínas Rab32 de <i>D. discoideum</i> contra proteínas Rab32 de hospederos mamíferos	64
Figura 8 – Análisis filogenético de las proteínas Rab32 codificadas en el genoma de la ameba <i>D. discoideum</i>	65
Figura 9 – Internalización y supervivencia intracelular de las mutantes Δ gtgE, Δ sopD2 y Δ gtgE Δ sopD2 en <i>S. Typhimurium</i> en <i>D. discoideum</i>	67
Figura 10 – Internalización y supervivencia intracelular de las mutantes Δ gtgE y Δ sopD2 de <i>S. Typhimurium</i> complementadas en <i>trans</i> durante la infección de <i>D. discoideum</i>	68
Figura 11 – Evaluación del retardo en el ciclo de desarrollo social de <i>D. discoideum</i> causado por distintas cepas de <i>S. Typhimurium</i>	70
Figura 12 – Cinética de retardo del desarrollo social de <i>D. discoideum</i> frente a distintas cepas de <i>S. Typhimurium</i>	72
Figura 13 – Evaluación de la distribución subcelular de la proteína de fusión Rab32A-GFP en <i>D. discoideum</i> mediante microscopía confocal	74

Figura 14 – Evaluación de la distribución subcelular de la proteína de fusión GFP-Rab32A en <i>D. discoideum</i> mediante microscopia confocal	76
Figura 15 – Actividad proteolítica del efector GtgE de <i>S. Typhimurium</i> sobre la proteína Rab32A de <i>D. discoideum</i>	79
Figura 16 – Distribución subcelular de la GTPasa Rab32A en <i>D. discoideum</i> y participación de los efectores GtgE y SopD2 de <i>S. Typhimurium</i> durante su interacción con la ameba	89
Figura 17 – Inmunodetección de las proteínas de fusión GtgE-CyaA' y SopD2-CyaA' en <i>S. Typhimurium</i>	103
Figura 18 – Contribución de nuevos pares efector/proteína inmunidad a la competencia interbacteriana en <i>S. Dublin</i>	105

5.- ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
µg/mL	Microgramos por mililitro
µL	Microlitros
µM	Micromolar
6xHis	Epítipo de 6 residuos de histidina
Amp	Ampicilina
BSA	Albúmina de suero bovino
Cam	Cloranfenicol
d	Días
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dox	Doxiciclina
EBU	Azul de Evans-uranina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ER	Retículo endoplasmático
FRT	Secuencia blanco de recombinación para Flp
<i>g</i>	Fuerza/aceleración gravitacional
g/L	Gramos por litro
GAP	Proteína activadora de GTPasas
GDI	Inhibidor de la disociación de GDP
GDP	Guanosina difosfato
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanosina
GFP	Proteína fluorescente verde
Glu	Glucosa
Gm	Gentamicina
GTP	Guanosina trifosfato
h	Horas
H151A	Histidina 151 por alanina
H ₂ O	Agua
HRP	Peroxidasa de rábano
Hyg	Higromicina
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
Kan	Kanamicina
kDa	Kilodaltons
kV	Kilovolts
L-Ara	L-arabinosa
LB	Luria-Bertani
LCV	Vacuola contenedora de <i>Legionella</i>
LRO	Organelos relacionados a lisosomas
MES	Ácido 2-morfolinoetanosulfónico
MetOH	Metanol

mg/mL	Miligramos por mililitro
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MOI	Multiplicidad de infección
mut	Mutante
OD _{600nm}	Densidad óptica a 600 nanómetros
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RPM	Revoluciones por minuto
SCV	Vacuola contenedora de <i>Salmonella</i>
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
Seg	Segundos
SPI	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i>
Str	Estreptomicina
SVP	Plasmidio de virulencia de <i>Salmonella</i>
T3SS	Sistema de secreción de tipo III
TAE	Tris acetado EDTA
TBS-T	Tampón Tris-base suplementado con Tween 20
TCA	Ácidos tricarbónicos
UFC	Unidades formadoras de colonias
WT	Cepa silvestre

6.- ABSTRACT

Role of *Salmonella* Typhimurium effectors GtgE and SopD2 in the inhibition of Rab32A recruitment to the *Salmonella*-containing vacuole in *Dictyostelium discoideum* and their contribution to intracellular survival and bacterial virulence

Salmonella is a genus of enteropathogenic bacteria grouping more than 2,600 serotypes, most of which infect warm-blooded animals. The interaction of *Salmonella* with its host is conditioned by multiple virulence factors, the most relevant during its infective cycle being two type III secretion systems (T3SSs) independently encoded in the pathogenicity islands SPI-1 (T3SS-1) and SPI-2 (T3SS-2). T3SSs translocate effector proteins directly to a eukaryotic cell to subvert its basic cellular processes. T3SS-1 and its effectors are essential for the invasion of *Salmonella* into host cells, where this bacterium survive and replicate intracellularly in a specialized membranous compartment, called the "*Salmonella*-containing vacuole" (SCV).

To establish and maintain the SCV during infection, *Salmonella* subverts vesicular trafficking inside host cell by a series of effectors translocated primarily by T3SS-2. Many of these effectors target small GTPases of the Rab family, such as Rab32. Among other functions, the Rab32 protein is part of a pathway that contributes to restricting the intracellular growth of pathogenic bacteria such as *Salmonella*, *Listeria* and *Mycobacterium*. In the case of *Salmonella*, Rab32 is recruited to the SCV and commands the delivery of itaconate, a mitochondrial metabolite with antimicrobial activity. The GtgE (cysteine protease) and SopD2 (GTPase activating protein; GAP) effectors of *Salmonella* Typhimurium act cooperatively to proteolyze Rab32 and prevent its recruitment to the

SCV, promoting the survival of the bacterium in macrophages, as well as its systemic colonization and virulence in mice.

During its life cycle, *Salmonella* interacts with amoebae and other phagocytic protozoa in the environment. The ability of *Salmonella* to survive intracellularly in amoebae, including in the model amoeba *Dictyostelium discoideum*, has already been described, but without exploring in depth the molecular mechanisms and virulence factors involved. Our group has reported that *S. Typhimurium* requires T3SS-1 and T3SS-2 to survive within *D. discoideum* residing intracellularly in an SCV-like compartment, similar to that previously described in macrophages. In addition, *D. discoideum* shares with macrophages many of the phagosome-associated proteins, including Rab32. In fact, in this amoeba there are 4 proteins homologous to Rab32 (Rab32A-D), being Rab32A the only one identified in phagosomes and associated with the "*Legionella*-containing vacuole" (LCV).

The aim of this work is to determine whether the effectors GtgE and SopD2 contribute to the intracellular survival and virulence of *S. Typhimurium* in *D. discoideum* by proteolysis of Rab32A protein and preventing its recruitment to the SCV. For this, Δ gtgE, Δ sopD2 and Δ gtgE Δ sopD2 mutants of *S. Typhimurium* were generated and their intracellular survival in *D. discoideum* was assessed by infection assays. In addition, the virulence of these mutants was assessed by social developmental assays in the amoeba. All mutants showed increased internalization and decreased intracellular survival compared to the wild-type strain. Also, the mutants were unable to retard amoeba social development, unlike the wild-type strain. The *trans* complementation of Δ gtgE and Δ sopD2 mutants restored wild-type levels of internalization, intracellular survival and the ability to delay the amoeba social cycle. In parallel, we identified by bioinformatic analysis that the four Rab32 proteins of *D. discoideum* share a high amino acid similarity with

mammalian Rab32 proteins, even conserving the sequence motif recognized by GtgE. To assess the proteolytic activity of GtgE, a Rab32A-6xHis fusion was generated for its recombinant expression in an *Escherichia coli* strain that also expresses the wild-type GtgE effector or a variant without catalytic activity (GtgE^{H151A}). Proteolysis of Rab32A-6xHis was observed when expression of wild-type GtgE and not the GtgE^{H151A} variant was induced. Finally, a *D. discoideum* lineage expressing a GFP-Rab32A fusion was generated to monitor its subcellular localization by confocal microscopy in amoebae infected with the wild-type or a Δ gtgE Δ sopD2 mutant strain of *S. Typhimurium*. In the absence of infection, GFP-Rab32A accumulated around intracellular compartments of variable size. This distribution was not altered in amoebae infected with either the wild-type or the Δ gtgE Δ sopD2 mutant strain.

Overall, the results obtained suggest that GtgE and SopD2 contribute to the intracellular survival and virulence of *S. Typhimurium* in *D. discoideum* and that all Rab32 proteins of the amoeba would be potential targets of GtgE, with Rab32A being effectively proteolyzed by the effector. On the other hand, Rab32A is associated with intracellular membranous compartments in *D. discoideum*, and this subcellular distribution that does not change during *S. Typhimurium* infection under the experimental conditions analyzed.

7.- RESUMEN

Salmonella es un género de bacterias enteropatógenas que agrupa más de 2.600 serotipos, los que en su mayoría infectan animales de sangre caliente. La interacción de *Salmonella* con su hospedero es condicionada por múltiples factores de virulencia, siendo los más relevantes durante su ciclo infectivo dos sistemas de secreción de tipo III (T3SSs) codificados independientemente en las islas de patogenicidad SPI-1 (T3SS-1) y SPI-2 (T3SS-2). Los T3SSs translocan proteínas efectoras directamente hacia una célula eucarionte para subvertir sus procesos celulares básicos. El T3SS-1 y sus efectores son esenciales para la invasión de *Salmonella* en células del hospedero, donde la bacteria sobrevive y se replica intracelularmente en un compartimiento membranosos especializado, llamado “vacuola contenedora de *Salmonella*” (SCV).

Para establecer y mantener la SCV durante el proceso infectivo, *Salmonella* subvierte el tráfico vesicular de la célula hospedera mediante una serie de efectores translocados principalmente por el T3SS-2. Muchos de estos efectores están dirigidos contra GTPasas pequeñas de la familia Rab, como Rab32. Entre otras funciones, la proteína Rab32 es parte de una vía que contribuye a restringir el crecimiento intracelular de bacterias patógenas como *Salmonella*, *Listeria* y *Mycobacterium*. En el caso de *Salmonella*, Rab32 es reclutada hacia la SCV y comanda la entrega de itaconato, un metabolito mitocondrial con actividad antimicrobiana. Los efectores GtgE (cisteína proteasa) y SopD2 (proteína activadora de GTPasa; GAP) de *Salmonella* Typhimurium actúan cooperativamente para proteolizar a Rab32 y prevenir su reclutamiento hacia la SCV, favoreciendo la supervivencia de la bacteria en macrófagos, así como su colonización sistémica y virulencia en ratones.

Durante su ciclo de vida, *Salmonella* interactúa con amebas y otros protozoos fagocíticos en el ambiente. La capacidad de *Salmonella* para sobrevivir intracelularmente en amebas, incluyendo en la ameba modelo *Dictyostelium discoideum*, se ha descrito sin profundizar en los mecanismos moleculares y factores de virulencia involucrados. Nuestro grupo ha reportado que *S. Typhimurium* requiere de los T3SS-1 y T3SS-2 para sobrevivir dentro de *D. discoideum*, residiendo intracelularmente en un compartimiento tipo SCV, similar a lo descrito previamente en macrófagos. Además, *D. discoideum* comparte con macrófagos muchas de las proteínas asociadas a fagosomas, incluyendo a Rab32. De hecho, en esta ameba existen 4 proteínas homólogas a Rab32 (Rab32A–D), siendo Rab32A la única identificada en fagosomas y asociada a la “vacuola contenedora de *Legionella*” (LCV).

En este trabajo, nos propusimos determinar si los efectores GtgE y SopD2 contribuyen a la supervivencia intracelular y virulencia de *S. Typhimurium* en *D. discoideum* al proteolizar a la proteína Rab32A e impedir que sea reclutada hacia la SCV. Para esto, se generaron las mutantes $\Delta gtgE$, $\Delta sopD2$ y $\Delta gtgE \Delta sopD2$ de *S. Typhimurium* y se evaluó su supervivencia intracelular en *D. discoideum* mediante ensayos de infección. Además, se evaluó la virulencia de estas mutantes mediante ensayos de retardo del desarrollo social en la ameba. Todas las mutantes mostraron un incremento en su internalización y una disminución en su supervivencia intracelular respecto a la cepa silvestre. Asimismo, las mutantes fueron incapaces de retardar el desarrollo social de ameba, a diferencia de la cepa silvestre. La complementación en *trans* de las mutantes $\Delta gtgE$ y $\Delta sopD2$ restauró los niveles silvestres de internalización, supervivencia intracelular y capacidad para retrasar el ciclo social de la ameba. Paralelamente, mediante análisis bioinformáticos se determinó que las 4 proteínas Rab32 de *D. discoideum* comparten una alta similitud aminoacídica con proteínas Rab32

de mamífero, conservando incluso el motivo de secuencia reconocida por GtgE. Para evaluar la actividad proteolítica de GtgE sobre Rab32A, se generó una fusión Rab32A-6xHis para su expresión recombinante en una cepa de *Escherichia coli* que también expresa el efector GtgE silvestre o una variante sin actividad catalítica (GtgE^{H151A}). La proteólisis de Rab32A-6xHis se observó al inducir la expresión de GtgE silvestre y no la variante GtgE^{H151A}. Por último, se generó un linaje de *D. discoideum* que expresa una fusión GFP-Rab32A para monitorear su localización subcelular mediante microscopia confocal en amebas infectadas con la cepa silvestre o una mutante $\Delta gtgE \Delta sopD2$ de *S. Typhimurium*. En ausencia de infección, GFP-Rab32A se acumuló alrededor de compartimientos intracelulares de tamaño variable. Esta distribución no se vio alterada en amebas infectadas con la cepa silvestre o con la mutante $\Delta gtgE \Delta sopD2$.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que GtgE y SopD2 contribuyen a la supervivencia intracelular y virulencia de *S. Typhimurium* en *D. discoideum* y sugieren que las 4 proteínas Rab32 de la ameba serían blancos potenciales de GtgE, siendo Rab32A efectivamente proteolizada por el efector. Por otro lado, Rab32A se asocia a compartimientos membranosos intracelulares en *D. discoideum*, en una distribución subcelular que no cambia durante la infección por *S. Typhimurium* bajo las condiciones experimentales analizadas.

8.- INTRODUCCIÓN

8.1. - Generalidades sobre el género *Salmonella*

El género *Salmonella* está compuesto por bacilos Gram negativo que se comportan como patógenos intracelulares facultativos (McQuiston *et al.*, 2008). Los miembros del género están agrupados en dos especies (*S. enterica* y *S. bongori*), que en conjunto pueden ser subdivididas en más de 2.600 serotipos (comúnmente denominados “serovares”) de acuerdo a la diversidad de sus principales antígenos de superficie (Brenner *et al.*, 2000; Popoff, 2001; Popoff *et al.*, 2004). Los serotipos de *S. enterica* infectan mayormente animales de sangre caliente y tienen una marcada diferencia en el rango de hospederos a los que pueden infectar. Los serotipos “generalistas”, como *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) y *S. Enteritidis*, infectan a un amplio número de hospederos animales, incluyendo a los humanos. Por su parte, los serotipos “especialistas” tienen un espectro muy limitado de hospederos, como *S. Typhi* y *S. Gallinarum* que infectan exclusivamente a humanos y aves, respectivamente (Canals *et al.*, 2011). Además, la manifestación clínica de la infección depende del serotipo de *Salmonella* y el hospedero animal al que infecte, abarcando desde una inflamación circunscrita al epitelio intestinal que causa una diarrea leve, hasta una infección sistémica que puede ser fatal (Fierer & Guiney, 2001).

Actualmente, *S. Typhimurium* junto a *S. Enteritidis* son los serotipos más prevalentes como agentes etiológicos de la salmonelosis transmitida por alimentos en el mundo (Guard-Petter, 2001; Canals *et al.*, 2011). *S. Typhimurium* es un patógeno generalista capaz de infectar aves, roedores y humanos, produciendo una infección sistémica similar a la fiebre tifoidea en ratones y polluelos, mientras que en humanos

causa una gastroenteritis autolimitada caracterizada por una diarrea inflamatoria acompañada por náuseas, vómitos, fiebre y dolor abdominal (Santos *et al.*, 2001).

8.2.- Ciclo infeccioso de *Salmonella*

La infección causada por *Salmonella* comienza por la ingestión de alimentos o agua contaminados con la bacteria, la cual sobrevive al pH ácido durante su tránsito a través del estómago hacia el íleon (García-del Portillo *et al.*, 1993). Aquí *Salmonella* penetra el epitelio intestinal, accediendo a la submucosa a través de las células M en las placas de Peyer (Jones *et al.*, 1994), de fagocitos CD18 positivos (Vázquez-Torres *et al.*, 1999) o de células epiteliales no fagocíticas, en las que la bacteria induce su propia fagocitosis. En el subepitelio, *Salmonella* es fagocitada por células fagocíticas profesionales como macrófagos y células dendríticas residentes en las placas de Peyer (Vázquez-Torres *et al.*, 1999). En el caso de *S. Typhimurium* o *S. Enteritidis* en humanos, el reconocimiento de la bacteria por los macrófagos induce una potente respuesta inflamatoria con secreción de citoquinas proinflamatorias e infiltración de leucocitos polimorfonucleares (McCormick *et al.*, 1995), limitando la infección al intestino. Por otro lado, análogamente a la infección de *S. Typhi* en humanos, cuando *S. Typhimurium* o *S. Enteritidis* infectan a un hospedero murino la bacteria es capaz de sobrevivir y proliferar en el interior de los macrófagos (Ochman *et al.*, 1996; Shea *et al.*, 1996; Hensel *et al.*, 1998), pudiendo diseminarse hacia los nódulos linfáticos mesentéricos, el bazo y el hígado (Vázquez-Torres *et al.*, 1999), así como también hacia la médula ósea y la vesícula biliar (Wain *et al.*, 2001; Sinnott & Teall, 1987).

8.3.- Mecanismo de patogenicidad y factores de virulencia de *Salmonella*

La interacción de *Salmonella* con su hospedero es condicionada por múltiples factores de virulencia, codificados en genes que están localizados mayoritariamente en regiones discretas del genoma definidas como “islas de patogenicidad de *Salmonella*” (SPIs). Estas regiones corresponden a fragmentos de DNA que fueron adquiridos mediante eventos de transferencia horizontal (Marcus *et al.*, 2000). En el genoma de *Salmonella enterica* se han identificado al menos 23 SPIs diferencialmente distribuidas entre los distintos serotipos, los que en su mayoría comparten 5 SPIs (SPI-1 a SPI-5) (Desai *et al.*, 2013), siendo SPI-1 y SPI-2 las de mayor relevancia a lo largo del ciclo infeccioso de la bacteria.

SPI-1 y SPI-2 codifican dos sistemas de secreción de tipo III (T3SSs) independientes (Galán & Curtiss, 1989; Hensel *et al.*, 1998), los cuales median la translocación de “proteínas efectoras” (también llamadas “efectores”) directamente hacia la membrana o el citoplasma de una célula hospedera (Izore *et al.*, 2011; Portaliou *et al.*, 2016). El T3SS codificado en SPI-1 (T3SS-1) participa principalmente en la invasión de células no fagocíticas durante la etapa intestinal de la infección, translocando una serie de efectores hacia las células que componen el epitelio del intestino (Galán & Curtiss, 1989; Jones *et al.*, 1994). Algunos de estos efectores causan un reordenamiento del citoesqueleto de actina, generando protrusiones de membrana que culminan en la internalización de la bacteria por parte de las células epiteliales a través de macropinocitosis (Hardt *et al.*, 1998; Patel & Galán, 2006).

Tras cruzar el epitelio intestinal, el T3SS-1 también le permite a *Salmonella* invadir células fagocíticas, como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, en cuyo interior la bacteria es retenida en una vesícula fagocítica (Alpuche-Aranda *et al.*, 1994).

Salmonella es capaz de sobrevivir al ambiente microbicida del fagosoma de estas células por acción de proteínas efectoras secretadas a través del T3SS codificado en SPI-2 (T3SS-2) (Ochman *et al.*, 1996; Shea *et al.*, 1996; Hensel *et al.*, 1998). Conjuntamente, los más de 30 efectores del T3SS-2 actúan remodelando la membrana del fagosoma y evitando su fusión con lisosomas, al interferir con el tráfico normal de la ruta endocítica celular (Carrol *et al.*, 1979; Steele-Mortimer *et al.*, 1999; Hernandez *et al.*, 2004; Drecktrah *et al.*, 2007). Este proceso deriva en la formación de un compartimiento membranoso especializado, denominado “vacuola contenedora de *Salmonella*” (SCV), dónde la bacteria sobrevive y prolifera intracelularmente. La biogénesis y mantención de la SCV, con marcada participación del T3SS-2 y sus efectores (y también de algunos efectores del T3SS-1), es crucial para la supervivencia y replicación de *Salmonella* en macrófagos y su capacidad para establecer una infección sistémica en modelos animales (Fields *et al.*, 1986; Hensel *et al.*, 1995; Richter-Dahlfors *et al.*, 1997).

8.4.- Alteración del tráfico vesicular en la ruta endo-lisosomal por *Salmonella*

Dentro del complejo proceso que permite establecer intracelularmente a la SCV como un nicho replicativo para *Salmonella*, un punto central consiste en evitar su fusión con lisosomas y con cualquier vesícula que transporte enzimas hidrolíticas y proteínas u otros compuestos con actividad antimicrobiana (Santos & Enninga, 2016). Para esto, *Salmonella* y otras bacterias intracelulares, como *Legionella pneumophila*, *Micobacterium tuberculosis* y *Listeria monocytogenes*, disponen de mecanismos para subvertir el tráfico de vesículas en el sistema endo-lisosomal de la célula hospedera, teniendo a las proteínas Rab como blancos recurrentes (Cossart & Roy, 2010). Estas proteínas corresponden a una familia de GTPasas monoméricas que determinan la

identidad de compartimientos membranosos y regulan la fisión y fusión de vesículas, así como el movimiento de éstas y de organelos en la célula (Pfeffer, 2013; Zhen & Stenmark, 2015). Fisiológicamente, la actividad de las proteínas Rab es controlada por sus respectivos factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs), proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) e inhibidores de disociación de nucleótidos de guanina (GDIs) (Cherfils & Zeghouf, 2013). Los efectores bacterianos pueden actuar modificando o proteolizando directamente a las proteínas Rab o indirectamente: (1) imitando a sus GEFs o GAPs, (2) modificándolos covalentemente o (3) degradándolos por proteólisis (Aktories, 2011).

Durante la biogénesis de la SCV algunos efectores de *Salmonella* se asocian, reclutan o afectan la distribución de algunas proteínas Rab en membranas (Spanò & Galán, 2018) (**Fig. 1A**). Tempranamente, la SCV adquiere a Rab4 (Smith *et al.*, 2005) y por acción del efector SopB también es reclutada Rab5 hacia su membrana, mientras que Rab8B, Rab13, Rab23 y Rab35 son excluidas de este compartimiento membranoso (Smith *et al.*, 2007; Bakowski *et al.*, 2010). También hay reclutamiento de Rab7 a la SCV, dónde es inhibida por el efector SopD2 (Schroeder *et al.*, 2010; D'Costa *et al.*, 2015). A su vez, el efector SifA secuestra a Rab9 impidiendo el reclutamiento hacia la SCV del receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes, que está involucrado en la entrega de enzimas lisosomales solubles a los lisosomas (García-del Portillo *et al.*, 1995; McGourty *et al.*, 2012). Las proteínas parálogas Rab32 y Rab38, y su compañero filogenéticamente más cercano, Rab29 (Klöpper *et al.*, 2012), son reclutadas diferencialmente hacia la SCV según el serotipo de *Salmonella*, estando presentes en la SCV de *S. Typhi* dónde incluso Rab29 es necesaria para la exocitosis de la toxina tifoidea (Spanò *et al.*, 2008), pero ausentes en la SCV de *S. Typhimurium*. La exclusión

de estas proteínas Rab de la SCV en *S. Typhimurium* es específicamente mediada por la acción de los efectores GtgE y SopD2 (Spanò, 2014) (**Fig. 1B**).

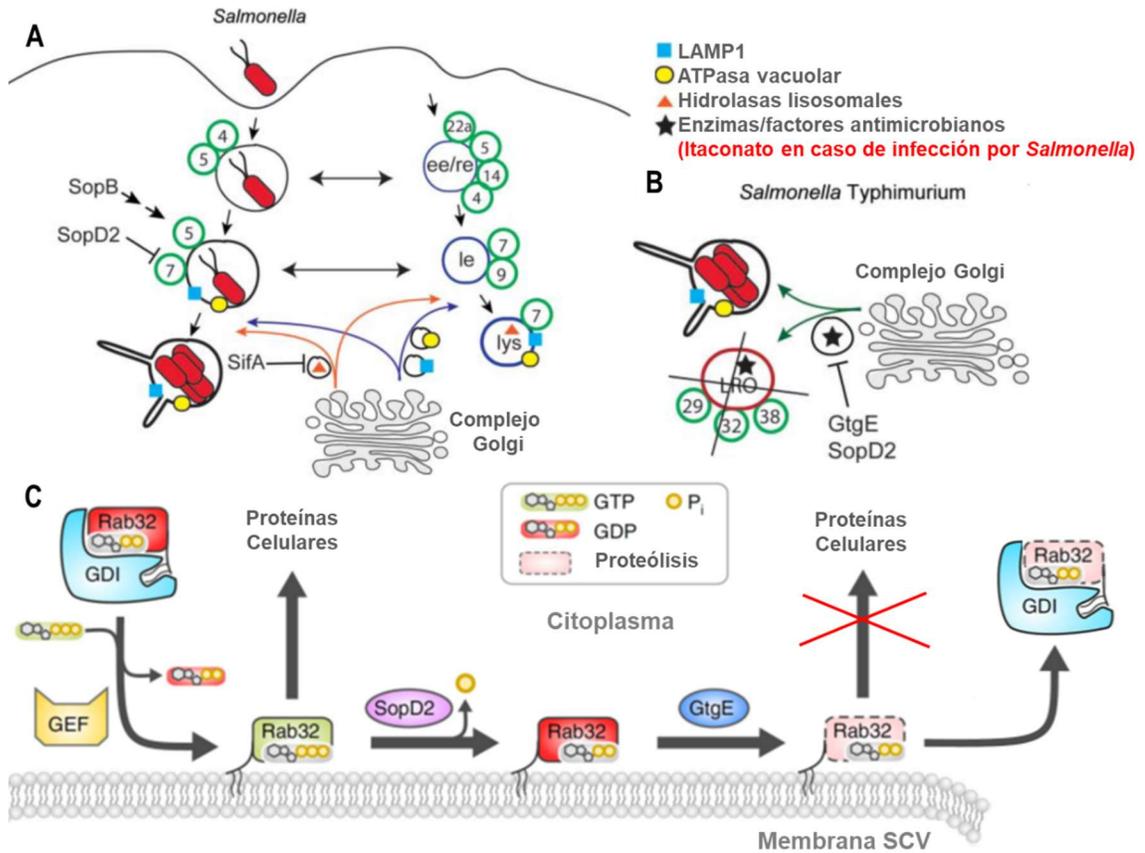


Figura 1. *Salmonella* subvierte el sistema endo-lisosomal en células eucariotes. (A) Normalmente, distintas proteínas Rab (○) se asocian a endosomas tempranos (ee/re), comandando su maduración a endosomas tardíos (le) y finalmente a lisosomas (lys), los cuales adquieren enzimas hidrolíticas (▲) y marcadores de membrana, como LAMP1 (■) y la ATPasa vacuolar (●). *Salmonella* a través de diferentes efectores (SopB, SopD2 y SifA, entre otros) altera el reclutamiento de proteínas Rab hacia la SCV, evitando su fusión con un lisosoma, lo cual permite que la bacteria sobreviva y se replique intracelularmente. **(B)** En serotipos generalistas como *S. Typhimurium*, los efectores GtgE y SopD2 actúan sobre Rab32 y otras Rab relacionadas para prevenir la entrega de enzimas y/o factores antimicrobianos (★), particularmente itaconato, hacia la SCV. **(C)** Rab32 es activada por la incorporación de GTP a través de un GEF, disociándose de su GDI que la mantiene soluble en el citoplasma y asociándose a distintas membranas, incluyendo la membrana de la SCV. Aquí SopD2 inactiva a Rab32 al estimular la hidrólisis de su molécula de GTP, siendo ahora sustrato para la proteólisis por parte de GtgE. Rab32 proteolizada permanece en una conformación similar a la de su estado inactivo, la cual le impide interactuar con otras proteínas celulares y permite que sea removida desde la membrana de la SCV por su GDI. Adaptado de Spanò & Galán, 2018 y Wachtel *et al.*, 2018.

8.5.- Participación de los efectores GtgE y SopD2 en la supervivencia intracelular de *Salmonella*

GtgE es un efector translocado a través del T3SS-1 y T3SS-2 (Spanò *et al.*, 2011), el cual es codificado dentro del profago lambdoide Gifsy-2 presente en serotipos generalistas de *Salmonella*, como *S. Typhimurium* (Ho *et al.*, 2002). A través de su extremo C-terminal (Kohler *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2016), este efector desarrolla una actividad cisteína proteasa contra múltiples GTPasas monoméricas, como Rab29, Rab32 y Rab38, interfiriendo así su reclutamiento hacia la SCV (Spanò *et al.*, 2011; Spanò & Galán, 2012; Spanò *et al.*, 2016). Por su parte, SopD2 es un efector que comparte una alta identidad y similitud aminoacídica con SopD (Jiang *et al.*, 2004); sin embargo, ambos efectores son genómica y funcionalmente diferentes. SopD es codificado en un gen localizado en el mismo *locus* cromosómico en todos los serotipos de *Salmonella* (Jiang *et al.*, 2004) y es translocado por el T3SS-1 y el T3SS-2 (Jones *et al.*, 1998; Brumell *et al.*, 2003), actuando cooperativamente con SopB durante la invasión de *S. Typhimurium* por macropinocitosis (Bakowski *et al.*, 2007). En contraste, SopD2 es codificado en un gen presente en *S. Gallinarum*, *S. Enteritidis* y algunas cepas de *S. Typhimurium* (Jiang *et al.*, 2004), siendo un efector translocado por el T3SS-2 y que está implicado en el control del tráfico vesicular ejercido intracelularmente por *Salmonella* (Brumell *et al.*, 2003). El extremo N-terminal de SopD2 es suficiente para asociarse a la SCV e inhibir el intercambio de nucleótido de Rab7 en su membrana, impidiendo la interacción con proteínas de andamiaje que unen a los motores moleculares dineína y kinesina. Esto entorpece el movimiento de compartimientos endocíticos, incluida la SCV, hacia los lisosomas (D'Costa *et al.*, 2015) y aumenta la disponibilidad de vesículas para el crecimiento de proyecciones membranosas desde la SCV (Schroeder *et al.*, 2010).

SopD2 también interactúa con Rab34 favoreciendo la maduración de la SCV (Teo *et al.*, 2017). Por otro lado, el extremo C-terminal de SopD2 contiene un motivo tipo “*arginine finger loop*” propio de las GAPs eucariontes, siendo capaz de estimular *in vitro* la hidrólisis de GTP en las proteínas Rab8A, Rab8B, Rab10 y Rab32 (Spanò *et al.*, 2016). SopD también tiene la capacidad de interactuar e inactivar a Rab8A, Rab8B y Rab10 mediante un motivo GAP en su extremo C-terminal (Boddy *et al.*, 2021; Lian *et al.*, 2021; Savitskiy *et al.*, 2021); sin embargo, no presenta dicha actividad sobre las proteínas Rab29, Rab32 y Rab38 (Savitskiy *et al.*, 2021). En el caso de Rab32, la actividad GAP de SopD2 previene su reclutamiento a la SCV al mantenerla en un estado inactivo unida a GDP (Spanò *et al.*, 2016). Sólo en esta condición Rab32 es un sustrato susceptible a proteólisis por GtgE, ya que este efector tiene baja afinidad por la GTPasa en su estado activo unida a GTP (Wachtel *et al.*, 2018). De este modo, la participación de SopD2 es requerida para que GtgE pueda actuar eficientemente sobre Rab32. La proteólisis por parte de GtgE no conduce a Rab32 a su degradación, sino que provoca que adopte permanentemente una conformación similar a la de su estado inactivo, en la cual no puede interactuar con otras proteínas celulares y puede ser removida desde la membrana de la SCV por su correspondiente GDI (**Fig. 1C**) (Savitskiy *et al.*, 2020).

Las proteínas Rab que son blanco de GtgE y SopD2, particularmente Rab32 y Rab38, participan en la biogénesis de compartimientos especializados llamados “organelos relacionados a lisosomas” (LROs), como melanosomas, gránulos densos en plaquetas o gránulos líticos en células T y neutrófilos (Dell’Angelica, 2004; Luzio *et al.*, 2014). La entrega de enzimas melanocíticas, enzimas hidrolíticas y una variedad de factores antimicrobianos hacia los diferentes LORs es coordinada principalmente por el reclutamiento de Rab32 y Rab38 junto a otras proteínas Rab (Wasmeier *et al.*, 2006; Benado *et al.*, 2009; Bultema *et al.*, 2012). Rab32 y Rab38 también se localizan en la

membrana del retículo endoplasmático (ER) y de las mitocondrias. De hecho, Rab32 ha sido implicada en otros procesos como regular la dinámica mitocondrial (Alto *et al.*, 202; Ortiz-Sandoval *et al.*, 2014), modular la apoptosis mediada por estrés de ER (Bui *et al.*, 2010) y promover la formación y maduración de autofagosomas como parte de la autofagia constitutiva (Hirota & Tanaka, 2009; Wang *et al.* 2012). Adicionalmente, Rab32 en conjunto con su GEF endógeno, el complejo 3 para la biogénesis de organelos relacionados a lisosomas (BLOC-3), constituirían una vía defensiva del hospedero para restringir el crecimiento intracelular de bacterias patógenas como *Salmonella* (Spanò & Galán, 2013; Solano *et al.*, 2018), *Mycobacterium leprae* (Zhang *et al.*, 2011), *M. tuberculosis* (Seto *et al.*, 2011) y *L. monocytogenes* (Li *et al.*, 2016). Un presunto mecanismo de la vía Rab32/BLOC-3 sería operar como un tipo no canónico de xenofagia (Tang, 2016), como ocurre para *L. monocytogenes* en células dendríticas, donde las bacterias que escapan hacia el citoplasma son rodeadas por múltiples capas de membranas cubiertas con Rab32 (Li *et al.*, 2016). En cuanto a *M. tuberculosis*, la hidrolasa lisosomal catepsina D es transportada hacia la vacuola contenedora de la bacteria con participación de Rab32 (Seto *et al.*, 2011). Asimismo, en el caso de *Salmonella* en células dendríticas y macrófagos de origen murino, Rab32/BLOC3 reduce la supervivencia intracelular de la bacteria al mediar la entrega de itaconato hacia la SCV (Chen *et al.*, 2020) (**Fig. 1B**). El itaconato es un metabolito mitocondrial con actividad antimicrobiana que inhibe enzimas que participan en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) y la vía de derivación del glioxilato (Chen *et al.*, 2020). De esta forma, la acción cooperativa de los efectores GtgE y SopD2 de *S. Typhimurium* evita que Rab32 sea reclutada hacia la SCV, impidiendo la consiguiente incorporación de itaconato en este compartimiento membranoso (**Fig. 1B**). Esto contribuye a la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* durante una infección *in vitro* y a su colonización

sistémica en un modelo murino (Spanò & Galán, 2012; Spanò *et al.*, 2016). Más aún, la expresión heteróloga de GtgE en *S. Typhi* (serotipo que carece de GtgE y donde SopD2 no es funcional) permite su replicación en macrófagos derivados de ratón pese a ser un hospedero no permisivo para esta bacteria (Spanò & Galán, 2012).

8.6.- Interacción de *Salmonella* con protozoos

La biogénesis de la SCV y la interferencia del tráfico vesicular, como parte de la maduración de este compartimiento, así como el rol de los múltiples efectores de *Salmonella* que comandan el proceso y el impacto que tienen en la supervivencia intracelular de la bacteria, son aspectos extensivamente caracterizados en el contexto de la infección de hospederos animales. No obstante, el ciclo de vida de *Salmonella* también abarca una etapa ambiental, durante la cual la bacteria está sometida a otras presiones selectivas, como lo es su interacción con protozoos (Vaerewijck *et al.*, 2014). Cabe destacar que la importancia de la SCV y de los efectores asociados a la biogénesis y maduración de este compartimiento membranoso ha sido muy poco estudiada en el contexto de esta interacción.

En el ambiente, *Salmonella* coexiste en contacto con diversos organismos depredadores, estando por ejemplo expuesta a la depredación por protozoos como las amebas de vida libre (Gourabathini *et al.*, 2008). Éstas son células naturalmente fagocíticas que se alimentan de bacterias mediante su fagocitosis y posterior degradación (Vaerewijck *et al.*, 2014). Evolutivamente, en muchas bacterias se han seleccionado mecanismos para sobrevivir y replicarse intracelularmente en protozoos. En el caso de *L. pneumophila*, la bacteria emplea un conjunto de genes comunes para sobrevivir intracelularmente en *Acanthamoeba polyphaga* y en macrófagos humanos

(Gao *et al.*, 1997; Segal & Shuman, 1999). Esto sugiere que las funciones que se habrían seleccionado en bacterias intracelulares durante su adaptación para sobrevivir dentro de protozoos en el ambiente, también contribuirían a su supervivencia al interior de células fagocíticas del sistema inmune en hospederos más complejos.

La interacción de *Salmonella* con *A. polyphaga* también ha sido documentada. Se ha reportado que *S. Typhimurium* es capaz de sobrevivir dentro de vesículas contráctiles en esta ameba (Gaze *et al.*, 2003). Asimismo, genes de SPI-2 y del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ asociados a la virulencia de *S. Typhimurium* contribuirían a su supervivencia intracelular en *A. polyphaga* (Bleasdale *et al.*, 2009). También se ha descrito que genes del plasmidio de virulencia de *Salmonella* (SVP) y de SPI-1 contribuirían a la supervivencia de *S. Dublin* en *Acanthamoeba rhyodes* (Tezcan-Merdol *et al.*, 2004). Adicionalmente, perfiles transcriptómicos globales han revelado que la expresión de genes contenidos en SPIs y en el SVP de *S. Choleraesuis* es inducida cuando la bacteria reside dentro de *A. rhyodes* (Feng *et al.*, 2009). Igualmente, en *S. Typhimurium* algunos genes requeridos para su supervivencia y replicación en células epiteliales y macrófagos humanos también incrementan su transcripción cuando la bacteria reside al interior de fagosomas en *Tetrahymena* (Rehfuss *et al.*, 2011). Todas estas observaciones sugieren que, al igual que en el caso de *L. pneumophila* (Gao *et al.*, 1997; Segal & Shuman, 1999), *Salmonella* utiliza un conjunto común de genes para sobrevivir intracelularmente en macrófagos y amebas de vida libre. A fin de identificar estos genes y caracterizar los mecanismos en que están involucrados, se precisa de un modelo válido y con un gran número de herramientas experimentales, como lo es la ameba social *Dictyostelium discoideum* (Verma & Srikanth, 2015).

8.7.- *Dictyostelium discoideum* como organismo modelo

En la naturaleza, *D. discoideum* es una ameba que habita suelos de bosques y que desarrolla un ciclo de vida complejo. Aunque crece como organismo unicelular fagocitando bacterias y hongos como alimento, *D. discoideum* es considerada una ameba social porque frente a la privación de nutrientes forma agregados multicelulares que llevan a cabo un proceso de diferenciación celular dirigido a la producción de esporas contenidas en el ápice de una estructura aérea (Flowers *et al.* 2010).

En años recientes, *D. discoideum* ha sido extensamente usada como un organismo modelo para estudiar la interacción patógeno-hospedero de una variedad de bacterias patógenas, entre ellas *Salmonella* (Steinert, 2011). Esto se debe en gran medida a sus diversas ventajas como modelo celular. El crecimiento de *D. discoideum* en laboratorio es relativamente sencillo y es un organismo que puede ser sometido a técnicas genéticas, bioquímicas y de biología molecular y celular. Además, *D. discoideum* es un fagocito profesional permisivo para la infección con múltiples bacterias patógenas, dónde se ha demostrado que factores de virulencia relevantes para el proceso infectivo en hospederos animales también resultan importantes en la interacción con esta ameba (Müller-Taubenberger *et al.*, 2013). Otra ventaja es la existencia de una comunidad científica bien organizada en torno a *D. discoideum*, que mantiene plataformas como “*dictyBase*” (<http://dictybase.org>) y “*Dicty Stock Center*”, a través de las cuales se brinda acceso a información y recursos biológicos y genómicos, como un repositorio de genomas y plasmidios (Fey *et al.*, 2013), sumado a una amplia colección de linajes celulares axénicos y cepas mutantes nulas o que expresan fusiones a marcadores fluorescentes para diversos genes de interés (Müller-Taubenberger *et al.*, 2013).

Inicialmente se reportó que *S. Typhimurium* era capaz de sobrevivir intracelularmente sólo en mutantes de *D. discoideum* deficientes para genes ligados a la autofagia, sugiriendo que esta ameba utiliza la autofagia para contrarrestar la infección por *Salmonella* (Jia *et al.*, 2009). En estudios más recientes, *S. Typhimurium* resultó patogénica para *D. discoideum*, inhibiendo la expresión de genes vinculados al desarrollo social de la ameba (Sillo *et al.*, 2011). Otros estudios muestran que *S. Typhimurium* puede sobrevivir dentro de la ameba por al menos 6 h luego de una infección (Frederiksen & Leisner, 2015). A este respecto, nuestro grupo determinó que *S. Typhimurium* tiene la capacidad de sobrevivir y proliferar intracelularmente en *D. discoideum* a tiempos más largos de infección, requiriendo de genes que también se han relacionados a su virulencia en otros hospederos (Riquelme *et al.*, 2016; Urrutia *et al.*, 2018; Varas *et al.*, 2018; Urrutia, 2019). En concordancia, un análisis comparativo a escala genómica de mutantes de *S. Typhimurium* bajo selección negativa permitió identificar un conjunto de ~213 genes necesarios para la supervivencia de la bacteria tanto en *D. discoideum* como en macrófagos murinos (**Fig. 2A**), entre ellos genes necesarios para que el T3SS-1 y el T3SS-2 sean funcionales (Sabag, 2017). También se determinó que, tras su internalización, *S. Typhimurium* residiría intracelularmente en *D. discoideum* dentro de un compartimiento vacuolar con marcadores compartidos por la SCV en otros tipos celulares (**Fig. 2B**), como células epiteliales y macrófagos. Para esto, la bacteria requiere la participación de los efectores SopB y SifA, conocidos por su rol en la biogénesis y maduración de la SCV en dichos modelos celulares (Valenzuela, 2019; Valenzuela *et al.*, 2021). Toda esta evidencia sugiere que el compartimiento intracelular donde reside *Salmonella* al infectar *D. discoideum* sería similar al que la bacteria tiene en células fagocíticas profesionales de hospederos superiores, como

macrófagos, valiéndose de los mismos mecanismos de virulencia para sobrevivir y replicarse intracelularmente.

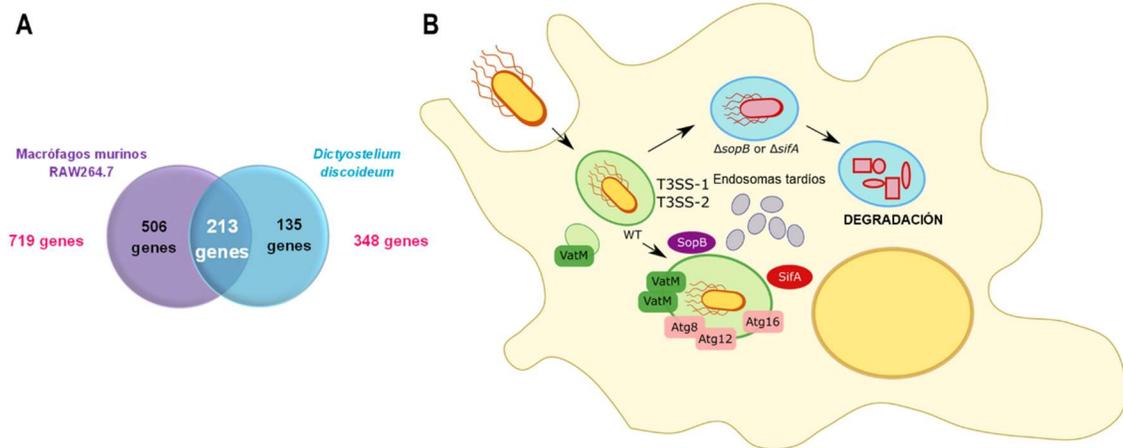


Figura 2. Comportamiento intracelular de *Salmonella Typhimurium* en *Dictyostelium discoideum*. (A) En un análisis a escala genómica de mutantes bajo selección negativa, se identificaron 719 genes necesarios para la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en macrófagos murinos (506 genes esenciales exclusivamente en este tipo celular), mientras que 348 genes fueron requeridos por la bacteria para sobrevivir dentro de *D. discoideum* (135 genes esenciales exclusivamente en la ameba). Del total de genes identificados en cada caso, un conjunto de 213 genes es necesario para que *S. Typhimurium* sobreviva intracelularmente en ambos hospederos celulares. (B) Luego de su internalización, *S. Typhimurium* sobrevive en *D. discoideum* dentro de un compartimento vacuolar especializado que comparte muchos marcadores celulares con la SCV establecida por la bacteria en células de hospederos animales, como por ejemplo la subunidad VatM de la ATPasa vacuolar. La supervivencia de *Salmonella* en este compartimento análogo a la SCV es dependiente de sus efectores SopB y SifA, cuya acción evita que la bacteria sea conducida a degradación en la ameba. Adaptado de Sabag, 2017 y Valenzuela *et al.*, 2021.

8.8.- Rab32 cómo blanco celular durante la infección por *Salmonella* en *Dictyostelium discoideum*

En la supervivencia intracelular de *Salmonella* es crucial la interferencia del tráfico vesicular en el sistema endo-lisosomal para evitar la fusión de la SCV con lisosomas o con otras vesículas que contengan componentes antimicrobianos (Santos & Enninga, 2016). En este sentido, las distintas proteínas Rab de la célula hospedera son blanco de algunos efectores de *Salmonella*, como es el caso de GtgE y SopD2 que actúan cooperativamente para evitar el normal reclutamiento de Rab32 hacia la SCV en

macrófagos de hospedero animales, contribuyendo a la supervivencia intracelular de la bacteria (Spanò *et al.*, 2016; Wachtel *et al.*, 2018).

En la ameba *D. discoideum* los eventos y componentes comprendidos en la ruta endo-lisosomal son conservados comparado a células animales (Duhon *et al.*, 2002; Maniak, 2002), compartiendo por ejemplo muchas de las proteínas asociadas a fagosomas (Boulais *et al.*, 2010). Dentro del 41,7 % del proteoma fagosómico compartido por *D. discoideum* y macrófagos murinos, que abarca principalmente a elementos del citoesqueleto, proteínas de tráfico celular y GTPasas pequeñas, también se incluye a Rab32 (Boulais *et al.*, 2010). El genoma de *D. discoideum* codifica 4 proteínas homólogas a Rab32 de mamífero (Rab32A–D), siendo Rab32A la única identificada experimentalmente en fagosomas (Gotthardt *et al.*, 2006) y asociada a vacuolas contenedoras de *Legionella* en la ameba (Hoffmann *et al.*, 2014; Schmolders *et al.*, 2017). Rab32A, también llamada RabE, es homóloga a las proteínas Rab29, Rab32 y Rab 38 humanas y a Rab29 de rata (Norian *et al.*, 1999), las cuales son efectivamente proteolizadas por el efector GtgE de *S. Typhimurium* (Spanò & Galán, 2012). Todas estas evidencias sugieren que durante la infección de *Salmonella* se podría impedir el reclutamiento de Rab32A hacia la SCV en *D. discoideum* a través de los efectores GtgE y SopD2. En este trabajo se evaluó si GtgE y SopD2 interfieren con el reclutamiento de Rab32A hacia la SCV en *D. discoideum* y su potencial impacto sobre la virulencia de *S. Typhimurium* y su capacidad para sobrevivir intracelularmente en la ameba. Este fenómeno no se ha estudiado previamente en *D. discoideum* y su caracterización constituye un aporte al conocimiento sobre mecanismos de patogenicidad de *Salmonella* conservados en su interacción con amebas ambientales y células fagocíticas de hospederos animales.

9.- HIPÓTESIS & OBJETIVOS

9.1.- Hipótesis

Los efectores GtgE y SopD2 actúan conjuntamente para proteolizar a Rab32A, evitando su reclutamiento a la vacuola contenedora de *Salmonella* en la ameba *Dictyostelium discoideum* y contribuyendo a la supervivencia intracelular y virulencia de *Salmonella* Typhimurium en este hospedero.

9.2.- Objetivo general

Determinar si los efectores GtgE y SopD2 de *Salmonella* Typhimurium contribuyen a su supervivencia intracelular y virulencia en la ameba *Dictyostelium discoideum* al proteolizar a la proteína Rab32A e impedir su reclutamiento hacia la vacuola contenedora de *Salmonella* en este hospedero.

9.3.- Objetivos específicos

9.3.1.- Objetivo Específico I.- Evaluar si los efectores GtgE y SopD2 contribuyen a la supervivencia intracelular y virulencia de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*. La supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum* se evaluó mediante ensayos de infección (Riquelme *et al.*, 2016) con la cepa bacteriana silvestre, las mutantes por delección $\Delta gtgE$ y $\Delta sopD2$, así como la doble mutante $\Delta gtgE \Delta sopD2$. La virulencia de la cepa silvestre y las mutantes de *S. Typhimurium* en *D. discoideum* se

determinó en base a su capacidad para retardar el desarrollo del ciclo social de la ameba (Urrutia *et al.*, 2018; Varas *et al.*, 2018).

9.3.2.- Objetivo Específico II.- Determinar si los efectores GtgE y SopD2 de *S. Typhimurium* interfieren con el reclutamiento de Rab32A hacia la SCV en *D. discoideum*. Se generó una línea de *D. discoideum* que expresa ectópicamente a Rab32A, como una proteína de fusión acoplada al reportero fluorescente GFP, desde un vector plasmidial bajo el control de un promotor inducible (Veltman *et al.*, 2009a; Veltman *et al.*, 2009b). La línea transformante de la ameba se infectó con *S. Typhimurium* silvestre y la doble mutante $\Delta gtgE \Delta sopD2$. Las cepas bacterianas se transformaron con un plasmidio que permite expresar el reportero fluorescente mCherry (Figueira *et al.* 2013). El reclutamiento de Rab32A hacia la SCV se monitoreó mediante microscopía confocal en amebas infectadas. Adicionalmente, la distribución subcelular de Rab32A en *D. discoideum* se evaluó en ausencia de infección.

9.3.3.- Objetivo Específico III.- Determinar si el efector GtgE de *S. Typhimurium* tiene actividad proteolítica contra Rab32A de *D. discoideum*. La proteólisis de Rab32A por parte de GtgE se analizó mediante inmunodetección en lisados bacterianos totales de cepas recombinantes de *Escherichia coli*, las cuales se co-transformaron con construcciones plasmidiales compatibles para expresar heterológicamente el efector silvestre de *S. Typhimurium* o una versión mutante sin actividad catalítica, junto a la GTPasa de *D. discoideum* (Spanò *et al.*, 2011). Rab32A se expresó como una proteína de fusión C-terminal al epítipo 6xHis para su detección mediante *Western blot* usando anticuerpos comerciales específicos.

10.- MATERIALES & MÉTODOS

10.1.- Cepas bacterianas

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

Tabla 1. Cepas bacterianas.

Salmonella enterica serotipo Typhi		
Cepa	Genotipo/Fenotipo Relevante	Origen
STH2370	Cepa silvestre	Colección laboratorio (NCBI: txid1443995)
Salmonella enterica serotipo Typhimurium		
Cepa	Genotipo/Fenotipo Relevante	Origen
14028s	Cepa silvestre	Colección laboratorio (NCBI: txid588858)
Δ gtgE	Δ gtgE::aph (Kan ^R)	Este trabajo
Δ sopD2	Δ sopD2::aph (Kan ^R)	Este trabajo
Δ gtgE Δ sopD2	Δ gtgE::aph (Kan ^R) Δ sopD2::FRT	Este trabajo
Δ aroA	Δ aroA::aph (Kan ^R)	Colección laboratorio (Riquelme <i>et al.</i> , 2016)
14028s / pBAD-TOPO	Cepa silvestre transformada con el vector pBAD-TOPO (Amp ^R) vacío.	Este trabajo
Δ gtgE / pBAD-TOPO	Cepa Δ gtgE transformada con el vector pBAD-TOPO (Amp ^R) vacío.	Este trabajo
Δ sopD2 / pBAD-TOPO	Cepa Δ sopD2 transformada con el vector pBAD-TOPO (Amp ^R) vacío.	Este trabajo
Δ gtgE / pBAD::gtgE	Cepa Δ gtgE transformada con el gen <i>gtgE</i> silvestre de <i>S. Typhimurium</i> 14028s clonado en el vector pBAD-TOPO (Amp ^R).	Este trabajo
Δ sopD2 / pBAD::sopD2	Cepa Δ sopD2 transformada con el gen <i>sopD2</i> silvestre de <i>S. Typhimurium</i> 14028s clonado en el vector pBAD-TOPO (Amp ^R).	Este trabajo
14028s / pFCcGi	Cepa silvestre transformada con el plasmidio pFCcGi (Amp ^R).	Este trabajo
Δ gtgE Δ sopD2 / pFCcGi	Cepa Δ gtgE Δ sopD2 transformada con el plasmidio pFCcGi (Amp ^R).	Este trabajo

<i>Escherichia coli</i>		
Cepa	Genotipo/Fenotipo Relevante	Origen
BW25113 / pKD46	$\Delta(\text{araD-araB})567 \Delta(\text{lacZ4787 lacI}p\text{-4000}(\text{lacI}Q) \lambda\text{-poS396}(\text{Am}) \text{rph-1} \Delta(\text{rhaD-rhaB})568 \text{rrnB-3 hsdR514} / \text{pKD46}$. Cepa portadora del plasmidio pKD46 (Amp ^R).	Colección laboratorio (Datsenko & Wanner, 2000)
DH5a / pCP20	F- $\text{phi80 lacZM15 endA recA hsdR}(\text{r-} \kappa \text{ m-} \kappa) \text{supE thi gyrA relA} \Delta(\text{lacZYA-argF})\text{U169} / \text{pCP20}$. Cepa portadora del plasmidio pCP20 (Amp ^R).	Colección laboratorio (Datsenko & Wanner, 2000)
DH5a λ pir / pCLF4	$\text{endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA relA1} \Delta(\text{lac-argF})\text{U169 deoR phi80} \Delta(\text{lac})\text{M15} \lambda \text{pir} / \text{pCLF4}$. Cepa portadora del plasmidio pCLF4 (Kan ^R).	Colección laboratorio (Santiviago <i>et al.</i> , 2009)
B/r / pFCcGi	Cepa B/r transformada con el plasmidio pFCcGi (Amp ^R).	Este trabajo
TOP10	F- $\text{mcrA} \Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC}) \phi 80 \text{lacZ} \Delta \text{M15} \Delta \text{lacX74 nupG recA1 araD139} \Delta(\text{ara-leu})7697 \text{galE15 galK16 rpsL}(\text{Str}^{\text{R}}) \text{endA1} \lambda^-$	Invitrogen
TOP10 / pGEM:: <i>rab32A</i>	Cepa TOP10 transformada con la secuencia codificante del gen <i>rab32A</i> de <i>D. discoideum</i> clonada en el vector pGEM-T (Amp ^R).	Este trabajo
TOP10 / pBAD:: <i>rab32A-6xHis</i>	Cepa TOP10 transformada con la secuencia codificante del gen <i>rab32A</i> de <i>D. discoideum</i> clonada como fusión C-terminal al epítipo 6xHis en el vector pBAD-TOPO (Amp ^R).	Este trabajo
TOP10 / pBAD:: <i>rab32A-6xHis</i> / pSEVA	Cepa TOP10 / pBAD:: <i>rab32A-6xHis</i> co-transformada con el vector pSEVA254 (Kan ^R) vacío.	Este trabajo
TOP10 / pBAD:: <i>rab32A-6xHis</i> / pSEVA:: <i>gtgE</i>	Cepa TOP10 / pBAD:: <i>rab32A-6xHis</i> co-transformada con el gen <i>gtgE</i> silvestre de <i>S. Typhimurium</i> 14028s clonado en el vector pSEVA254 (Kan ^R).	Este trabajo
TOP10 / pBAD:: <i>rab32A-6xHis</i> / pSEVA:: <i>gtgE</i> _{H151A}	Cepa TOP10 / pBAD:: <i>rab32A-6xHis</i> co-transformada con el alelo mutante catalítico H151A del gen <i>gtgE</i> de <i>S. Typhimurium</i> 14028s clonado en el vector pSEVA254 (Kan ^R).	Este trabajo
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
Cepa	Genotipo/Fenotipo Relevante	Origen
DBS0351098	Cepa silvestre	<i>Dicty Stcok Center</i> (<i>dictyBase</i>)

10.2.- Plasmidios

Los distintos plasmidios usados durante el desarrollo de esta tesis se detallan en

la **Tabla 2**.

Tabla 2. Listado de plasmidios.

Plasmidio	Descripción	Origen
pKD46	<i>bla P_{BAD} gam bet exo oriR_{pSC101}</i> (TS), Amp ^R (GenBank AY048746).	Datsenko & Wanner, 2000
pCP20	<i>bla cat cl857 I_{PR} flp oriR_{pSC101}</i> (TS), Amp ^R , Cam ^R .	Datsenko & Wanner, 2000
pCLF4	<i>bla FRT aph FRT PS1 PS2 oriR6K</i> , Amp ^R , Kan ^R , promotor T7 (GenBank EU629214).	Santiago <i>et al.</i> , 2009
pGEM-T	Vector comercial de clonamiento, Amp ^R .	Promega
pBAD-TOPO	Vector comercial de expresión, Amp ^R .	Thermo Scientific
pFCcGi	Vector que contiene clonado el gen que codifica la proteína eGFP bajo el control del promotor <i>P_{BAD}</i> (inducible) y el gen que codifica la proteína mCherry bajo el control del promotor de <i>rpsM</i> (constitutivo), Amp ^R .	Figueira <i>et al.</i> , 2013
pSEVA254	Vector de expresión inducible. <i>aph P_{lacUV5} repB lacI^q P_{trc} ori_{RSF1010}</i> , Kan ^R .	Jahn <i>et al.</i> , 2016
pDM334	Vector de expresión inducible extracromosómico. Transactivador rTA M2s*. Fusión N-terminal a eGFP (<i>BglII/SpeI</i>), G418 ^R , Amp ^R (ID# 522).	<i>Plasmid Catalog (dictyBase)</i> Veltman <i>et al.</i> , 2009b
pDM1045	Vector de expresión constitutivo (<i>P_{act15}</i>) extracromosómico. Fusión C-terminal a eGFP (<i>BglII/SpeI</i>), Hyg ^R , Amp ^R .	Veltman <i>et al.</i> , 2009a
pBAD:: <i>gtgE</i>	Vector pBAD-TOPO que contiene clonado el gen <i>gtgE</i> silvestre (incluyendo su promotor nativo) de <i>S. Typhimurium</i> 14028s, Amp ^R .	Este trabajo
pBAD:: <i>sopD2</i>	Vector pBAD-TOPO que contiene clonado el gen <i>sopD2</i> silvestre (incluyendo su promotor nativo) de <i>S. Typhimurium</i> 14028s, Amp ^R .	Este trabajo
pBAD:: <i>rab32A</i> -6xHis	Vector pBAD-TOPO que contiene clonada la secuencia codificante del gen <i>rab32A</i> de <i>D. discoideum</i> como fusión génica C-terminal al epitopo 6xHis, Amp ^R .	Este trabajo
pGEM:: <i>rab32A</i>	Vector pGEM-T que contiene clonada la secuencia codificante del gen <i>rab32A</i> de <i>D. discoideum</i> , Amp ^R .	Este trabajo
pDM334:: <i>rab32A</i>	Vector pDM334 que contiene clonada la secuencia codificante del gen <i>rab32A</i> de <i>D. discoideum</i> como fusión génica N-terminal a la proteína eGFP, G418 ^R , Amp ^R .	Este trabajo
pDM1045:: <i>rab32A</i>	Vector pDM1045 que contiene clonada la secuencia codificante del gen <i>rab32A</i> de <i>D. discoideum</i> como fusión génica C-terminal a la proteína eGFP, Hyg ^R , Amp ^R .	Este trabajo

pSEVA:: <i>gtgE</i>	Vector pSEVA254 que contiene clonado el gen <i>gtgE</i> silvestre de <i>S. Typhimurium</i> 14028s, Kan ^R .	Este trabajo
pSEVA:: <i>gtgE</i> _{H151A}	Vector pSEVA254 que contiene clonado alelo mutante catalítico H151A del gen <i>gtgE</i> de <i>S. Typhimurium</i> 14028s, Kan ^R .	Este trabajo

10.3.- Partidores

Los oligonucleótidos de DNA empleados como partidores para PCR y mutagénesis durante el desarrollo de esta tesis se presentan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para PCR y mutagénesis.

Nombre	Secuencia 5'-3'
<i>gtgE</i> _H1P1	CGAGTATATTATGTTAAGACACATTCAAAAATAGTTTAGGCCGTGCAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>gtgE</i> _H2P2	AGGTTAACTATCATAAAAATGGTACACCAGTCTTTCAGGACATATGAATATCCTCCTTAG
<i>gtgE</i> _Out5	CCTGCAGGGAAAAATCGATAA
<i>gtgE</i> _Out3	AGGCTGGTTTTTAAGGGGAA
<i>gtgE</i> _promoter_5	ATACCAACAAAAGCGATCGC
<i>gtgE</i> _3ORF	TCATAAAAATGGTACACCAGTC
<i>gtgE</i> _pSEVA5	GGAATTCTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTTAAGACACATTCAAAAATAG
<i>gtgE</i> _pSEVA3	GCTCTAGATCATAAAAATGGTACACCAGTC
pSEVA_F	CTCCCGTTCTGGATAATGTT
pSEVA_R	GAGACACAAATTTAAATCGTAATTA
pBAD_Fw	ATGCCATAGCATTTTTATCC
pBAD_Rv2	ATTCTGTTTTATCAGACCGC
<i>sopD2</i> _H1P1	GGGAGTTATTATGCCAGTTACGTTAAGTTTTGGTAATCGTGTGCAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>sopD2</i> _H2P2	TAATGACTTTTTATATAAGCATATTGCGACAACTCGACTTCATATGAATATCCTCCTTAG
<i>sopD2</i> _Out5	GGGTTTATGGACACATTCCG
<i>sopD2</i> _Out3	CTCCCTGACGAAAAGAACAGC
<i>sopD2</i> _promoter_5	ATACCAACAAAAGCGATCGC
<i>sopD2</i> _3ORF	TTATATAAGCATATTGCGACAAC
5 <i>rab32A</i> _pDM334	GAAGATCTATGTCAAACAACCCAGCTG
3 <i>rab32A</i> _pDM334	GCTCTAGATTATTTACAACAACCTTGGACC
pDM334_Dir	TTTGTAACAGCTGCTGGG
pDM334_Rev	CTTCTATCGCCTTCTTGACC

5rab32A_pDM1045	GAAGATCTAAAAATGTCAAACAACCCAGCTG
3rab32A_pDM1045	GCTCTAGATTTACAACAACCTGGACCAG
pDM1045_Dir	GGTTTAAAAAACTTGGGTTGG
pDM1045_Rev	CCTTCAAATTTAACTTCTGC
rab32A_ORF5	ATGTCAAACAACCCAGCTG
rab32A_6xHis3	TTATCAATGGTGATGGTGATGATGACCAGAACCACCTTTACAACAACCTGGACCAG

El segmento subrayado en la secuencia de algunos partidores corresponde a la región que hibrida con su respectivo DNA molde. En el caso de los partidores no subrayados, toda la secuencia del oligonucleótido hibrida con su DNA molde.

10.4.- Medios y condiciones de cultivo bacteriano

Las cepas bacterianas se propagaron rutinariamente a 37°C (o a 30°C cuando contenían plasmidios termosensibles) en medio Luria-Bertani (LB; extracto de levadura 5 g/L, triptona 10 g/L, NaCl 5 g/L), suplementado con Bacto-Agar 15 g/L como agente gelificante. Los inóculos para los distintos ensayos experimentales se prepararon en caldo LB y se incubaron con agitación (150 rpm) a la misma temperatura. Cuando se requirió, el medio LB se suplementó con los antibióticos ampicilina (Amp; 100 µg/mL) o kanamicina (Kan; 75 µg/mL) para seleccionar y/o propagar bacterias transformantes o mutantes. En los cultivos bacterianos preparados para los ensayos de actividad proteolítica, el caldo LB se suplementó con L-arabinosa 10 mM y/o IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) 1 mM para inducir la expresión de las proteínas recombinantes o con L-glucosa 0,2% para su represión catabólica.

10.5.- Líneas celulares eucariontes

Los distintos linajes celulares de la ameba *D. discoideum* utilizados en esta tesis se especifican en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Linajes celulares de *D. discoideum*.

Línea celular	Descripción	Origen
<i>D. discoideum</i> AX4	Linaje silvestre axénico de la ameba <i>D. discoideum</i> (dictyBase ID DBS0302402)	Knecht <i>et al.</i> , 1986
<i>D. discoideum</i> AX4 GFP-Rab32A	Linaje AX4 de <i>D. discoideum</i> transformado con un derivado del plasmidio pDM334 que contiene clonada la secuencia codificante del gen <i>rab32A</i> de la ameba para la expresión inducible de la proteína Rab32A fusionada en su extremo N-terminal al reportero fluorescente eGFP.	Este trabajo
<i>D. discoideum</i> AX4 Rab32A-GFP	Linaje AX4 de <i>D. discoideum</i> transformado con un derivado del plasmidio pDM1045 que contiene clonada la secuencia codificante del gen <i>rab32A</i> de la ameba para la expresión constitutiva de la proteína Rab32A fusionada en su extremo C-terminal al reportero fluorescente eGFP.	Este trabajo

10.6.- Medios y condiciones de cultivo celular eucariontes

Los linajes de *D. discoideum* se cultivaron de acuerdo a protocolos estandarizados (Fey *et al.*, 2007). En breve, las amebas se inocularon sobre un césped bacteriano de *K. pneumoniae* DBS0351098 previamente cultivada en agar SM (triptona 10 g/L, extracto de levadura 1 g/L, MgSO₄ x 7H₂O 1,08 g/L, KH₂PO₄ 1,9 g/L, K₂HPO₄ x 3H₂O 0,78 g/L, glucosa 10 g/L, Bacto-Agar 20 g/L) e inactivada por exposición a radiación ultravioleta durante 20 min. Cuando las placas de fagocitosis fueron visibles en el césped bacteriano, las amebas se recolectaron desde el frente de fagocitosis y se cultivaron con agitación (125 rpm) a 22°C en 10 mL de medio líquido HL5 (triptona 14 g/L, extracto de levadura 7 g/L, Na₂HPO₄ 0,35 g/L, KH₂PO₄ 1,2 g/L; pH 6,3) suplementado con Amp (100 µg/mL) y estreptomycin (Str; 300 µg/mL) en matraces Erlenmeyer de 50 mL. A contar de este primer cultivo líquido, las amebas se subcultivaron en 20 mL de medio HL5 suplementado sólo con Amp en matraces Erlenmeyer de 100 mL hasta alcanzar un estado axénico a partir del tercer subcultivo. Las amebas siempre se subcultivaron cuando su población alcanzó la fase de crecimiento exponencial temprana (~1–2 x 10⁶ células/mL), para lo cual su concentración celular se monitoreó

periódicamente mediante recuento en cámara de Neubauer con tinción de azul de tripán. En el caso de los linajes transformantes, se ejecutó el mismo procedimiento de cultivo con algunas modificaciones. El primer cultivo líquido se efectuó en botellas de cultivo celular T25 con 5 mL de medio HL5 y los subcultivos posteriores en botellas T75 con 10 mL del medio. La incubación se realizó en estático para permitir la adherencia de las amebas, las que se subcultivaron mediante desprendimiento mecánico al alcanzar una confluencia celular de ~90% respecto al total de la superficie inferior de la botella. El medio HL5 se suplementó adicionalmente con los antibióticos para eucariontes higromicina (Hyg, 50 µg/mL) o geneticina (G418, 10 µg/mL), según se requirió, para mantener la selección de los plasmidios recombinantes.

10.7.- Extracción de DNA genómico bacteriano

El DNA genómico de *S. Typhimurium* 14028s (**Tabla 1**), se extrajo empleando el sistema comercial “*GenElute Bacterial Genomic DNA Kit*” (Sigma-Aldrich) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La cepa se cultivó en 5 mL de caldo LB a 37°C con agitación durante 24 h. La elución final del DNA se hizo en 100 µL de H₂O libre de nucleasas a 65°C y luego se almacenó a -20°C hasta su uso.

10.8.- Extracción de DNA plasmidial

Los distintos plasmidios utilizados en esta tesis (**Tabla 2**) se extrajeron desde sus respectivas cepas portadoras (**Tabla 1**) usando el sistema comercial “*QIAprep Spin Miniprep kit*” (QIAGEN), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para ello, las cepas se cultivaron en caldo LB suplementado con Amp o con Kan, según fue requerido, y se

incubaron durante 24 h con agitación a 37°C (o 30°C en el caso de plasmidio termosensibles). En la etapa final de la extracción, el DNA plasmidial se eluyó en 50 µL de H₂O libre de nucleasas a 65°C y luego se almacenó a 4°C hasta su uso.

10.9.- Generación de las mutantes Δ gtgE y Δ sopD2 de *S. Typhimurium* por el método *Red-swap*

Las mutantes de *S. Typhimurium* con deleciones específicas en los genes *gtgE* y *sopD2* se construyeron a partir del fondo genético de la cepa silvestre 14028s (**Tabla 1**). La deleción de cada gen y la simultánea inserción de un *cassette* de resistencia a Kan se realizó mediante el método de intercambio alélico por recombinación homóloga de productos PCR dependiente de la recombinasa Red del fago λ (*Red-Swap*), según lo descrito en la literatura (Datsenko & Wanner, 2000) con ciertas adaptaciones (Santiviago *et al.*, 2009).

10.9.1.- Obtención de productos PCR para mutagénesis

Se utilizaron partidores con un tamaño de 60 nucleótidos (nombrados con la notación “H1P1” y “H2P2”) (**Tabla 3**), los cuales en su extremo 5' contienen 40 nucleótidos idénticos a las regiones que flanquean al gen blanco. Por otro lado, en su extremo 3' los partidores tienen 20 nucleótidos que hibridan con el extremo 5' o 3' del *cassette* de resistencia a antibiótico del plasmidio pCLF4 (**Tabla 2**). Dentro del *cassette*, que se encuentra flanqueado por los sitios FRT (*Flp recombinase target sequence*), está contenido el gen *aph* que codifica la enzima aminoglicósido 3' fosfotransferasa que

confiere resistencia a Kan. A partir del plasmidio pCLF4 purificado, el *cassette* de resistencia a Kan se amplificó mediante PCR en las siguientes condiciones:

Mezcla de Reacción PCR			Programa de Termociclador		
Reactivo	Volumen (µL)	Concentración	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Tampón PCR 10x	5	1x	95°C	3 min	1
MgCl ₂ [50 mM]	1,5	1,5 mM	95°C	30 seg	
dNTPs 50x [10 mM cada uno]	1	0,2 mM	55°C	30 seg	30
Partidor H1P1 [10 µM]	1	1 µM	72°C	2 min	
Partidor H2P2 [10 µM]	1	1 µM	72°C	5 min	1
DNA (pCLF4)	0,5	-	12°C	∞	-
Taq DNA polimerasa [5 U/µL]	0,3	1,5 U/Rx			
H ₂ O libre de nucleasas	39,7	-			
Volumen final		50 µL			

El fragmento amplificado se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% en solución amortiguadora TAE 1x y tinción con GelRed 1x. La corrida electroforética se efectuó a 100 V durante 35 min. Una vez que se verificó su tamaño (~1.500 pb), el amplicón se purificó mediante el sistema comercial “*QIAquick PCR Purification Kit*” (QIAGEN), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En la etapa final de la extracción, el amplicón se eluyó en 50 µL de H₂O libre de nucleasas a 65°C y luego se almacenó a -20°C hasta su uso.

10.9.2.- Preparación de bacterias electrocompetentes y transformación bacteriana

Un cultivo de *S. Typhimurium* 14028s (**Tabla 1**), crecido en caldo LB a 37°C con agitación durante 24 h, se subcultivó en dilución 1:100 en 20 mL de caldo LB fresco y se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0,4–0,6. A fin de obtener bacterias electrocompetentes, la biomasa correspondiente a 5 mL de cultivo se sedimentó por centrifugación a 5.350 x *g* durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se descartó y el sedimento se sometió a 3 lavados consecutivos con 1 mL de glicerol 15%

frío. En cada lavado, la suspensión bacteriana se centrifugó a 15.600 x g durante 2 min a temperatura ambiente, descartando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento cada vez. Finalmente, el sedimento bacteriano se resuspendió en 95 µL de glicerol 15% frío.

S. Typhimurium se transformó mediante electroporación con el plasmidio pKD46 (**Tabla 2**), el cual es un plasmidio termosensible que contiene los genes que codifican las subunidades de la recombinasa Red del fago λ bajo un promotor inducible por arabinosa (*P_{araBAD}*) (Datsenko & Wanner, 2000). Para la electroporación, una alícuota de 95 µL de la suspensión de bacterias electrocompetentes se mezcló con 5 µL (~100–500 ng) del plasmidio purificado y se incubó en hielo durante 5 min. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 1 mm (de separación entre sus electrodos) enfriada a -20°C y se aplicó un pulso eléctrico de 1,8 KV usando un electroporador “*E. coli Pulser*” (Bio-Rad). Inmediatamente después de la electroporación, la suspensión de bacterias se recuperó agregando 900 µL de caldo LB fresco e incubando a 30°C con agitación durante 60 min. Por último, las bacterias se sembraron sobre agar LB suplementado con Amp y se incubaron a 30°C durante 24 h para seleccionar colonias transformantes resistentes al antibiótico.

10.9.3.- Mutagénesis por intercambio alélico de productos PCR

Colonias de *S. Typhimurium* 14028s transformadas con el plasmidio pKD46 se cultivaron en caldo LB suplementado con Amp y L-glucosa 0,2% a 30°C con agitación durante 24 h. Las bacterias se subcultivaron a razón 1:100 en 20 mL de caldo LB fresco suplementado con Amp y se incubaron con agitación a la misma temperatura hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0,4–0,6. En ese momento, se adicionó L-arabinosa hasta

alcanzar una concentración final de 10 mM para inducir la expresión del sistema de recombinación λ -Red, codificado en el plasmidio. Después de una incubación de 60 min a 30°C con agitación, se prepararon bacterias electrocompetentes como se describió anteriormente (ver **Sección 10.9.2**).

Un volumen de 80 μ L de la suspensión de bacterias electrocompetentes se mezcló con 20 μ L de producto PCR (Kan^R) purificado obtenido a partir del plasmidio pCLF4 como DNA molde (ver **Sección 10.9.1**). La mezcla se incubó durante 5 min en hielo, se transfirió a una cubeta de electroporación de 1 mm (de separación entre sus electrodos) enfriada a -20°C y luego se realizó la transformación por electroporación aplicando un pulso eléctrico de 1,8 KV usando un electroporador “*E. coli Pulser*” (Bio-Rad). Las bacterias se recuperaron inmediatamente en 1 mL de LB fresco incubando a 37°C (temperatura restrictiva para la replicación del plasmidio pKD46) con agitación durante 60 min. Las colonias mutantes se seleccionaron sembrando en agar LB suplementado con Kan e incubando a 37°C durante 24 h.

10.9.4.- Comprobación de las colonias mutantes por PCR

El reemplazo alélico en cada mutante de *S. Typhimurium* 14028s se verificó mediante PCR de colonias utilizando partidores específicos según el gen mutagenizado. Los partidores, nombrados con la notación “Out5” y “Out3” (**Tabla 3**), hibridan en regiones externas río arriba y río abajo respecto al sitio de intercambio del gen blanco por el *cassette* de resistencia a antibiótico en el cromosoma mediante la recombinación homóloga durante la mutagénesis. Como DNA molde, se usó una suspensión de las colonias mutantes en 200 μ L de H₂O libre de nucleasas estéril. La mezcla de reacción y la amplificación por PCR se realizó según el siguiente protocolo:

Mezcla de Reacción PCR			Programa de Termociclador		
Reactivo	Volumen (µL)	Concentración	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Tampón PCR 5x	4	1x	95°C	5 min	1
MgCl ₂ [25 mM]	1,2	1,5 mM	95°C	30 seg	
dNTPs 50x [10 mM cada uno]	0,4	0,2 mM	55°C	30 seg	30
Partidor Out5 [10 µM]	0,4	0,2 µM	72°C	1,5 min	
Partidor Out3 [10 µM]	0,4	0,2 µM	72°C	5 min	1
DNA (suspensión bacteriana)	2	-	4°C	∞	-
<i>GoTaq</i> DNA polimerasa [5 U/µL]	0,2	1 U/Rx			
H ₂ O libre de nucleasas	11,4	-			
Volumen final		20 µL			

El fragmento amplificado se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% en solución amortiguadora TAE 1x y tinción de GelRed 1x. La corrida electroforética se efectuó a 100 V durante 35 min.

10.10.- Transducción de alelos mutantes en *S. Typhimurium*

A fin de eliminar cualquier mutación secundaria que se pudiera haber generado durante la mutagénesis mediante el método *Red-Swap*, el alelo mutante correspondiente se movilizó mediante transducción generalizada desde el cromosoma de cada mutante generada hacia el fondo genético silvestre de *S. Typhimurium* 14028s utilizando el bacteriófago P22 HT105/1 *int*-201 (Maloy, 1990).

10.10.1.- Preparación del lisado de partículas transductantes

Cada cepa mutante (cepa donadora) se cultivó en caldo LB suplementado con Kan a 37°C durante 24 h. Una mezcla de 200 µL del cultivo bacteriano y 1 mL de caldo de fago P22 (100 mL de LB suplementado con 100 µL de un lisado concentrado de fago P22 HT105/1 *int*-201, 2 mL de medio mínimo E 50x (MgSO₄×7H₂O 10 g/L, ácido cítrico

monohidratado 100 g/L, $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ 500 g/L, $NaNH_4HPO_4 \times 4H_2O$ 175 g/L) y L-glucosa hasta alcanzar una concentración final de 2% p/v), se incubó a 37°C con agitación durante 16 h para permitir la infección de la cepa dadora. El cultivo se centrifugó a 18.300 x g durante 1 min a temperatura ambiente para eliminar remantes celulares. El sobrenadante se recolectó y esterilizó por adición de 100 µL de cloroformo y agitación vigorosa en vórtex, seguido de lo cual se repitió la centrifugación para separar la fase acuosa de la orgánica. El lisado generado se almacenó a 4°C para su uso posterior.

10.10.2.- Transducción

S. Typhimurium 14028s (cepa receptora) se cultivó en caldo LB a 37°C con agitación durante 24 h. La transducción se realizó mezclando 200 µL del cultivo de la cepa receptora con 20 µL del lisado de fago P22 obtenido a partir de la respectiva cepa mutante. La mezcla se incubó a 37°C durante 30 min sin agitación para permitir la adsorción de las partículas transductantes y luego se centrifugó a 18.300 x g durante 1 min a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en 200 µL de caldo LB fresco y se incubó a 37° con agitación durante 20 min para permitir la expresión fenotípica de la resistencia a Kan codificada por el alelo mutante transducido. Las colonias transductantes se seleccionaron sembrando la mezcla de transducción en agar LB suplementado con Kan e incubando a 37°C durante 24 h.

10.10.3.- Comprobación y selección de transductantes

La correcta movilización del alelo mutante por transducción se comprobó mediante PCR en colonias (ver **Sección 10.9.4**) escogidas aleatoriamente entre los clones resistentes a Kan. Para remover la posible contaminación con partículas remanentes del fago P22, las colonias transductantes comprobadas por PCR se aislaron repetidamente en agar EBU (agar LB suplementado con K_2HPO_4 2,5 g/L, azul de Evans 12,5 mg/L, uranina 25 mg/L y glucosa 2 g/L) suplementado con Kan hasta obtener colonias sin evidencia de lisis a causa de la infección por el fago P22 (colonias blancas). La ausencia del fago P22 en las transductantes aisladas se verificó evaluando su sensibilidad al bacteriófago lítico P22 H5 mediante un ensayo de *cross streaking*. En este ensayo, las colonias a analizar se sembraron cruzando en forma perpendicular una línea trazada con 50 μ L de lisado del fago P22 H5 sobre la superficie de una placa de agar EBU, la cual fue incubada a 37°C durante 24 h. Finalmente, se seleccionaron y respaldaron aquellas transductantes libres de fago P22 que fueron sensibles al fago P22 H5.

10.11.- Construcción de la mutante doble Δ gtgE Δ sopD2 de *S. Typhimurium*

Las colonias mutantes en las que se confirmó mediante PCR el reemplazo alélico del gen *sopD2* (Δ sopD2::*aph*; **Tabla1**) se aislaron consecutivamente en agar LB suplementado con Kan, incubando las placas a temperatura restrictiva (37°C) para inhibir la replicación del plasmidio pKD46. En un último aislamiento, algunas colonias se sembraron paralelamente en agar LB y en agar LB suplementado con Amp, a fin de verificar la pérdida del plasmidio a través de la recuperación de la sensibilidad de las

bacterias al antibiótico. Posteriormente, las mutantes $\Delta sopD2::aph$ libres del plasmidio pKD46 se transformaron por electroporación (ver **Sección 10.9.2**) con el plasmidio termosensible pCP20 (**Tabla 2**), que codifica la recombinasa Fli. Esta recombinasa escinde por recombinación el *cassette* de resistencia a antibiótico flanqueado por los sitios FRT, dejando como remanente una copia única del sitio FRT en el cromosoma (Datsenko y Wanner, 2000). Las transformantes se seleccionaron sembrando en agar LB suplementado con Amp e incubando a 30°C durante 24 h. Luego, se escogieron ~30 colonias para incubación a 37°C (temperatura restrictiva para la replicación del plasmidio pCP20 y que induce la expresión de la recombinasa Fli) en agar LB y en agar LB suplementado con Kan, repitiendo el proceso hasta que sólo se presentara crecimiento en el medio sin el antibiótico. La escisión del *cassette* de resistencia a antibiótico se comprobó por PCR de las colonias crecidas en agar LB sin antibiótico, analizando los fragmentos amplificados por electroforesis (ver **Sección 10.9.4**). Finalmente, las mutantes $\Delta sopD2::FRT$ comprobadas por PCR se cultivaron paralelamente en agar LB y agar LB suplementado con Amp a 37°C, verificando la pérdida del plasmidio pCP20 al recuperar colonias sensibles al antibiótico.

Para la construcción de la mutante doble $\Delta gtgE \Delta sopD2$ (**Tabla 1**) de *S. Typhimurium* 14028s, la mutación $\Delta gtgE::aph$ se movilizó hacia al fondo genético de la mutante $\Delta sopD2::FRT$ como cepa receptora mediante transducción generalizada con el bacteriófago P22 (ver **Sección 10.10**), utilizando el correspondiente lisado de partículas transductantes generado previamente (ver **Sección 10.10.1**). El genotipo final de la doble mutante se confirmó mediante PCR y electroforesis (ver **Sección 10.9.4**) de las colonias resistentes a Kan obtenidas tras completar el proceso de transducción.

10.12.- Complementación en *trans* de las mutantes Δ *gtgE* y Δ *sopD2* de *S. Typhimurium*

Las mutantes Δ *gtgE* y Δ *sopD2* de *S. Typhimurium* se complementaron en *trans* usando el sistema comercial “*pBAD TOPOTM TA Expression Kit*” (Invitrogen). Este sistema incluye el vector de expresión pBAD-TOPO (**Tabla 2**), en el cual se clonó una copia silvestre del gen *gtgE* o *sopD2* (incluyendo sus promotores nativos) para ser reincorporado en su respectiva cepa mutante. El vector pBAD-TOPO confiere resistencia a Amp y contiene un promotor inducible por L-arabinosa (P_{araBAD}) río arriba del sitio de clonamiento.

El alelo silvestre de cada gen se amplificó por PCR a partir de DNA genómico de *S. Typhimurium* 14028s (ver **Sección 10.7**). La amplificación se realizó utilizando la polimerasa de alta fidelidad Phusion (NEB) y los partidores “*promoter_5*” y “*3ORF*” (**Tabla 3**) específicos de *gtgE* y *sopD2*, de acuerdo al siguiente protocolo:

Mezcla de Reacción PCR			Programa de Termociclador		
Reactivo	Volumen (µL)	Concentración	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Tampón PCR <i>High Fidelity</i> 5x	10	1x	98°C	5 min	1
dNTPs 50x [10 mM cada uno]	1	0,2 mM	95°C	30 seg	30
Partidor 5 [10 µM]	2,5	0,5 µM	55°C	30 seg	
Partidor 3 [10 µM]	2,5	0,5 µM	72°C	1 min	
DNA	1	-	72°C	5 min	1
<i>Phusion</i> DNA polimerasa [2 U/µL]	0,5	0,5 U/Rx	4°C	∞	-
H ₂ O libre de nucleasas	32,5	-			
Volumen final		50 µL			

El partidor “*promoter_5*” hibrida en un sitio río arriba del gen respectivo para abarcar su región promotora, mientras que el partidor “*3ORF*” hibrida justo en el extremo 3’ del marco de lectura correspondiente, incluyendo su codón de término. Cada fragmento amplificado se confirmó por electroforesis en gel de agarosa (ver **Sección**

10.9.4), se purificó desde banda mediante el sistema comercial “QIAquick Gel Extraction Kit” (QIAGEN) y se clonó en el vector pBAD-TOPO según el protocolo del fabricante. Como parte del proceso de clonamiento, se incorporaron adenosinas terminales en los extremos 3’ del fragmento de PCR (reacción de *A-tailing*), pues éstas son removidas durante la amplificación debido a la actividad correctora de la DNA polimerasa de alta afinidad. Los plasmidios recombinantes (pBAD::*gtgE* y pBAD::*sopD2*; **Tabla 2**) generados tras el clonamiento, se utilizaron para transformar por separado la cepa comercial quimiocompetente de *E. coli* “One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli*” (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las bacterias transformantes se seleccionaron sembrando en agar LB suplementado con Amp e incubando a 37°C durante 24 h, luego de lo cual la presencia del plasmidio en las colonias se verificó por PCR (ver **Sección 10.9.4**). Considerando que el vector pBAD-TOPO es provisto como una molécula lineal, la reacción de ligación durante el clonamiento puede originar plasmidios en que el gen de interés se haya insertado a favor o en contra del sentido del promotor P_{araBAD} . La incorporación del inserto y su orientación se determinaron mediante PCR utilizando las parejas de partidores pBAD_Fw/pBAD_Rev2 y pBAD-Fw/“3ORF”, respectivamente (**Tabla 3**). Los partidores pBAD_Fw/“3ORF” producen un amplicón específico únicamente si el gen clonado está orientado a favor del promotor inducible. Algunas de las transformantes de *E. coli*, con una amplificación positiva en el PCR de colonia, se cultivaron en caldo LB suplementado con Amp a 37°C durante 24 h para la extracción de los respectivos plasmidios recombinantes (ver **Sección 10.8**). La fidelidad (i.e., ausencia de mutaciones) de la secuencia de los genes *gtgE* y *sopD2* en los plasmidios recombinantes se confirmó mediante secuenciación (ver **Sección 10.17**).

Las mutantes $\Delta gtgE$ y $\Delta sopD2$ de *S. Typhimurium* se transformaron por electroporación (ver **Sección 10.9.2**) con los plasmidios pBAD::*gtgE* y pBAD::*sopD2*, respectivamente. En cada caso, las transformantes se seleccionaron sembrando en agar LB suplementando con Amp e incubando a 37°C por 24 h, luego de lo cual las colonias transformantes se confirmaron por PCR (ver **Sección 10.9.4**) empleando los partidores pBAD_Fw/pBAD_Rev2 (**Tabla 3**). Adicionalmente, la cepa silvestre *S. Typhimurium* 14028s y sus mutantes $\Delta gtgE$ y $\Delta sopD2$, se transformaron con el vector pBAD-TOPO circularizado vacío para obtener controles de complementación (**Tabla 1**).

10.13.- Ensayo de internalización y supervivencia intracelular en *Dictyostelium discoideum*

La internalización y supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* 14028s y cualquiera de sus mutantes derivadas (**Tabla 1**) en la ameba *D. discoideum*, se evaluó *in vitro* a través de ensayos de infección en competencia entre cada mutante particular y la cepa silvestre (**Fig. 3**). La mutante metabólica $\Delta aroA$ se incluyó como control de virulencia atenuada por presentar defectos para sobrevivir intracelularmente en *D. discoideum*, como se ha reportado con anterioridad por nuestro grupo (Riquelme *et al.*, 2016).

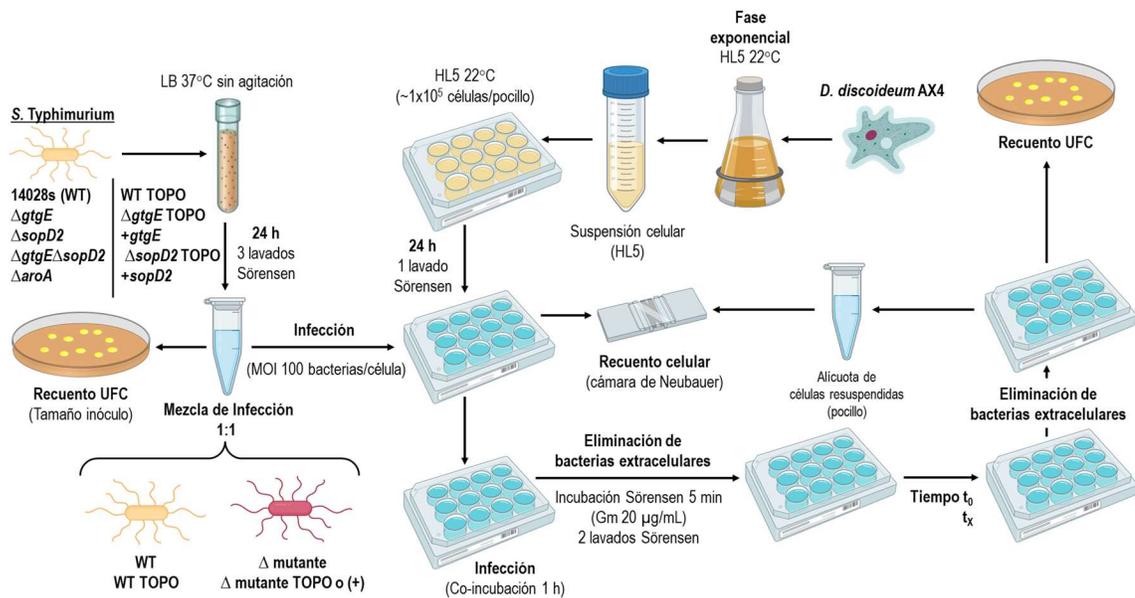


Figura 3. Ensayos de internalización y supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*. Amebas del linaje AX4 de *D. discoideum* se infectaron mediante co-incubación durante 1 h con una mezcla bacteriana 1:1 de la cepa silvestre y cada mutante de *S. Typhimurium* 14028s usando una MOI de 100 bacterias/ameba. La MOI real se calculó en base al recuento de UFC de la mezcla bacteriana utilizada para la infección. Luego del periodo de co-incubación, las bacterias extracelulares se eliminaron por incubación durante 5 min con solución amortiguadora Sørensen 1x suplementada con gentamicina, seguido de 2 lavados con solución amortiguadora Sørensen 1x sin antibiótico. Este tratamiento se repitió a los diferentes tiempos de infección, luego de lo cual las amebas en cada pocillo de la placa se desprendieron por resuspensión enérgica y se extrajo una pequeña alícuota para su recuento en cámara de Neubauer con tinción de azul de tripan. Las amebas restantes se lisaron por acción de Tritón X-100 0,2 % para recuperar las bacterias intracelulares, las cuales se cuantificaron por recuento de UFC. La internalización de cada cepa se determinó a tiempo 0 h, mientras que su supervivencia intracelular se determinó a los tiempos 2, 6 y 20 h.

10.13.1.- Infección de *D. discoideum* con *S. Typhimurium*

El día previo a la infección, amebas correspondientes al linaje AX4 de *D. discoideum* (**Tabla 4**) en fase exponencial de crecimiento, se sembraron en medio HL5 suplementando con Amp a una densidad de $\sim 5 \times 10^5$ células/pocillo ($\sim 500 \mu\text{L}$) en una placa de cultivo celular de 12 pocillos, permitiendo su adherencia por incubación a 22°C durante 24 h. Paralelamente, las cepas bacterianas se cultivaron en 3 mL de caldo LB o caldo LB suplementado con Kan, según fue requerido, incubando a 37°C sin agitación por 24 h. Al día siguiente, las amebas no adheridas se removieron mediante 1 lavado con solución amortiguadora Sørensen 1x (KH_2PO_4 2 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0,36

g/L; pH 6,0) estéril. El número de amebas viables se cuantificó por recuento en cámara de Neubauer con tinción de azul de tripán a partir de un pocillo en que las células se desprendieron por resuspensión enérgica con 1 mL de Sörensen 1x. Una alícuota de 1 mL de cada cultivo bacteriano se sedimentó por centrifugación a $18.300 \times g$ durante 2 min y se sometió a 3 lavados con 1 mL de solución amortiguadora Sörensen 1x, centrifugando cada vez. Finalmente, el sedimento de bacterias se resuspendió en 1 mL de la solución amortiguadora. Un volumen de la suspensión bacteriana de cada mutante se mezcló por separado con la suspensión de la cepa silvestre para obtener una mezcla de infección con una cantidad de bacterias totales suficiente para conseguir una multiplicidad de infección (MOI) de 100 bacterias/célula, respecto al número promedio de amebas determinando previamente para cada pocillo. Para que cada mezcla de infección contenga bacterias de la cepa silvestre y de la respectiva mutante en una proporción 1:1, se mezclaron volúmenes de las correspondientes suspensiones bacterianas que, de acuerdo a la curva de crecimiento específica de cada cepa, contenían el número de bacterias viables necesario para establecer una MOI de 50 bacterias/célula. A fin de conocer la MOI real empleada, el número de bacterias viables en cada mezcla de infección se determinó por dilución seriada en PBS 1x (10^0 – 10^{-7}) y recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en agar LB y agar LB suplementado con Kan, incubando a 37°C durante 24 h. El recuento en agar LB es indicativo de las UFC totales, mientras que las UFC contabilizadas en agar LB suplementado con Kan corresponden sólo a la cepa mutante. El descuento entre las UFC totales y las UFC de la cepa mutante equivale a las UFC de la cepa silvestre.

Las amebas se infectaron mediante co-incubación con las diferentes mezclas de infección a 22°C durante 60 min en duplicado técnico. Luego, las bacterias extracelulares se eliminaron mediante una incubación con solución amortiguadora Sörensen 1x

suplementado con gentamicina (Gm; 20 µg/mL) durante 5 min, seguido de 2 lavados con solución amortiguadora Sörensen 1x sin antibiótico. Este punto se considera como el tiempo de incubación 0 h y el mismo tratamiento se repitió a los tiempos 3, 6 y 20 h. A continuación de eliminar las bacterias extracelulares en cada tiempo, las amebas se desprendieron en los pocillos respectivos por resuspensión vigorosa con 500 µL de solución amortiguadora Sörensen 1x y luego se extrajo una alícuota de 20 µL para monitorear la viabilidad celular de las amebas mediante recuento en cámara de Neubauer con tinción de azul de tripán. Inmediatamente, las amebas desprendidas en el pocillo se lisaron por acción de 500 µL de Tritón X-100 al 0,4% en solución amortiguadora Sörensen 1x (completando un volumen total de ~1 mL y una concentración final de 0,2% de Tritón X-100) durante 5 min para recuperar las bacterias intracelulares, cuyas UFC se determinaron mediante dilución seriada en PBS 1x (10^0 – 10^{-7}) y siembra en agar LB y agar LB suplementado con Kan, incubando a 37°C durante 24 h.

10.13.2.- Internalización relativa, índice de competencia, análisis estadístico y expresión de resultados

La internalización relativa se calculó como la razón entre las UFC de cada mutante (mut) y las UFC de la cepa silvestre (WT) después del tiempo de co-incubación de las amebas con las bacterias ($t=0$) dividido por la razón entre las UFC de las mutantes y las UFC de la cepa silvestre en la mezcla de infección o inóculo (i), según la fórmula $[UFC_{mut}/UFC_{WT}]_{t=0}/[UFC_{mut}/UFC_{WT}]_i$. La supervivencia intracelular de cada cepa bacteriana se determinó a través de un índice de competencia (IC), el cual se expresó en escala logarítmica en base 2 (Log_2) para los tiempos de infección 3, 6 y 20 h. Este índice se calculó como la razón entre las UFC de las mutantes y las UFC de la cepa

silvestre a cada tiempo de infección ($t=x$) dividido por la misma razón al tiempo 0 h ($t=0$), según la fórmula $[UFC_{mut}/UFC_{WT}]_{t=x}/[UFC_{mut}/UFC_{WT}]_{t=0}$. Para las mutantes $\Delta gtgE$, $\Delta sopD2$ y $\Delta gtgE \Delta sopD2$, los datos provienen de 4 réplicas biológicas se analizaron a través de su media aritmética o promedio, utilizando el error estándar del promedio (SEM) como indicador de su grado de dispersión. La internalización relativa e IC de cada mutante se comparó contra un valor teórico de referencia, el cual representa una condición en que no existe una diferencia entre el comportamiento de la mutante analizada y la cepa silvestre. La significancia estadística de las diferencias detectadas se determinó a través de la prueba *One-Sample t-Test*. Este mismo tratamiento se aplicó a los datos obtenidos de 3 réplicas biológicas para las mutantes $\Delta gtgE$ y $\Delta sopD2$ complementadas en *trans*. Adicionalmente, en la comparación de cada mutante complementada en *trans* respecto a su contraparte transformada con el vector vacío, la validación estadística se realizó a través de una prueba ANOVA de una cola para la internalización relativa y de dos colas para la supervivencia intracelular. En ambos casos, se ejecutó a continuación la prueba de comparación múltiple de Tukey. En todos los análisis se estableció un intervalo de confianza mínimo del 95%, considerando estadísticamente significativa una diferencia con un valor $P < 0,05$. Todo el procesamiento estadístico de los datos y la elaboración de gráficos se realizó con el programa *GraphPad Prism 9.0* (GraphPad Software Inc.).

10.14.- Ensayos de retardo del ciclo de desarrollo social de *D. discoideum*

La virulencia de *S. Typhimurium* 14028s y todas sus mutantes derivadas (**Tabla 1**), se evaluó en *D. discoideum* de acuerdo a la capacidad de las bacterias para retrasar el ciclo de desarrollo social de la ameba (Urrutia *et al.*, 2018; Varas *et al.*, 2018).

La mutante $\Delta aroA$ se utilizó como control de virulencia atenuada por su deficiencia para enlentecer el desarrollo social de *D. discoideum*, mientras que *K. pneumoniae* (**Tabla 1**) se incluyó en los ensayos como un control de viabilidad celular por ser una cepa bacteriana no patogénica para la ameba y que se usa rutinariamente como su alimento.

D. discoideum se inoculó sobre un césped de las distintas cepas bacterianas y se monitoreó periódicamente el crecimiento de la ameba a lo largo del tiempo (**Fig. 4A**). Para esto, cada una de las cepas se cultivó en caldo LB, suplementado con Kan según el caso, y se incubaron a 37°C sin agitación durante 24 h. Un volumen de 1 mL de cada cultivo se sedimentó por centrifugación a 18.300 x g durante 2 min, se lavó 3 veces con 1 mL de solución amortiguadora Sørensen 1x y el sedimento obtenido se resuspendió en el mismo volumen de la solución amortiguadora. Una alícuota de 30 µL de las suspensiones bacterianas se depositó separadamente en pocillos individuales de una placa microtituladora de 24 pocillos, cada uno de cuales contenía 2 mL agar N (solución amortiguadora Sørensen 1x suplementado con triptona 1 g/L, glucosa 1g/L, Bacto-Agar 20 g/L). Al momento de inocular las suspensiones bacterianas, la placa se inclinó y se realizó un movimiento circular para que la alícuota inoculada cubriera la totalidad de la superficie del agar en el pocillo, permitiendo la formación de un césped bacteriano uniforme tras una incubación a 22°C durante 24 h. A partir de un cultivo de *D. discoideum* AX4 en fase exponencial de crecimiento, se preparó una suspensión de amebas con una concentración de 1×10^6 células/mL en solución amortiguadora Sørensen 1x. En el centro de cada uno de los césped bacterianos, se inoculó una alícuota de 10 µL de la suspensión de amebas ($\sim 10^4$ amebas totales) y la placa se incubó a 22°C durante 7 días. A lo largo de este periodo, se monitoreó la cinética del desarrollo social de *D. discoideum* capturando imágenes cada 24 h mediante una lupa estereoscópica Motic SMZ-171

equipada con una cámara digital Moticam 580 (5,0 MP) anclada al puerto triocular de la lupa a través de un adaptador C (0,5x).

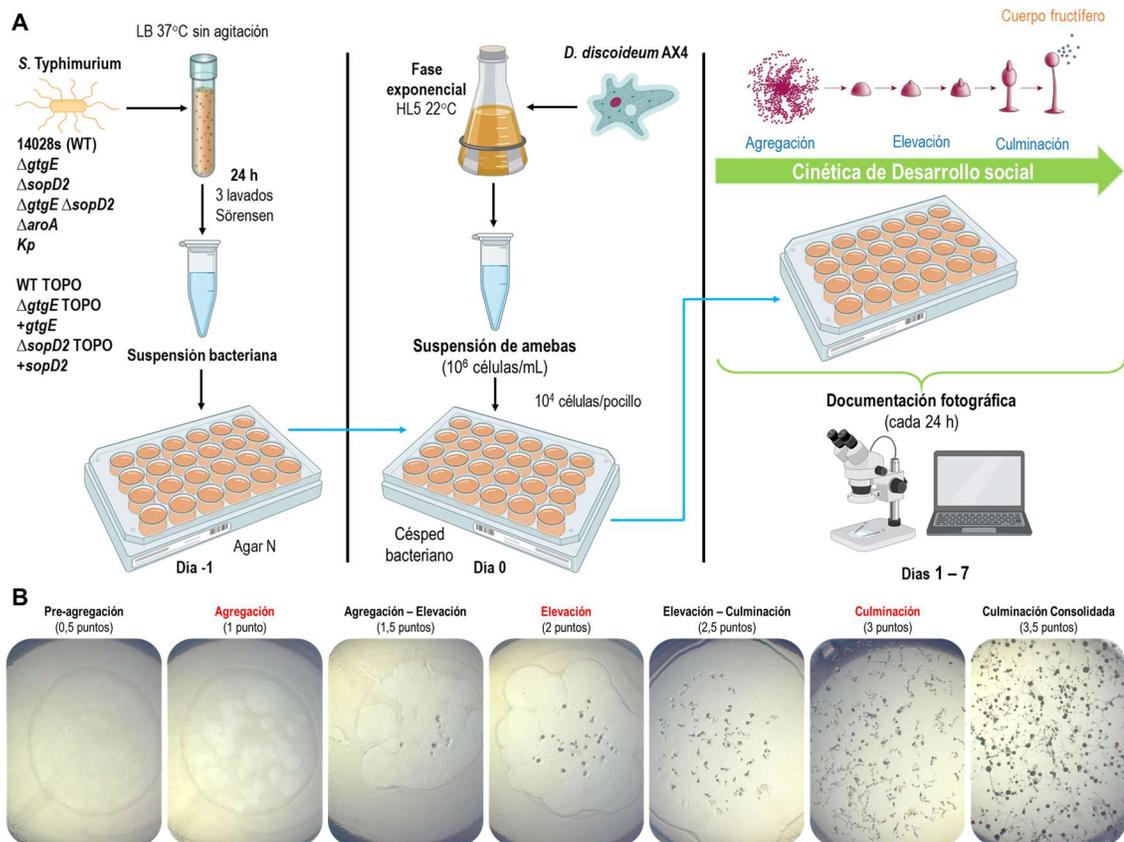


Figura 4. Ensayo de retardo del ciclo de desarrollo social de *D. discoideum*. (A) El desarrollo social de *D. discoideum* AX4 se monitoreó cada 24 h durante 7 días después de inocular $\sim 10^4$ amebas sobre un césped bacteriano de *S. Typhimurium* 14028s y las distintas mutantes derivadas. (B) Imágenes representativas de las etapas de agregación, elevación y culminación, así como de sus transiciones, en la escala de puntuación definida para evaluar de manera semicuantitativa la cinética del ciclo de desarrollo social de la ameba.

Las imágenes provenientes de 3 réplicas biológicas se analizaron visualmente por parte de 5 observadores independientes bajo un esquema doble ciego, asignando un puntaje al estado de desarrollo alcanzado por las amebas cada día según una escala previamente descrita (Varas *et al.*, 2018) con modificaciones (Fig. 4B). La escala modificada considera 3 etapas principales: agregación (1 punto), elevación (2 puntos) y culminación (3 puntos). En agregación, las placas de fagocitosis generadas por las

amebas se encuentran claramente definidas, tienen distintos tamaños y están en proceso de unificarse. En la fase de elevación, estas placas han derivado en un frente de fagocitosis unificado y en expansión con numerosas estructuras elevadas tempranas (como “montículos”). Por último, en culminación, ya no se observa un frente de fagocitosis y gran parte de la superficie del medio sólido está cubierta por una mezcla de estructuras elevadas, incluyendo algunas tardías con aparición de cuerpos fructíferos y soros. Los estados previos, de transición y posteriores a las etapas principales del ciclo de desarrollo social de la ameba se calificaron con puntajes intermedios. En pre-agregación (0,5 puntos), las amebas están formando placas de fagocitosis incipientes, mientras que en la transición de agregación – elevación (1,5 puntos) las placas de fagocitosis están fusionadas y presentan múltiples núcleos de agregación y/o aparición de pocas estructuras elevadas tempranas. En la transición de elevación – culminación (2,5 puntos), el frente de fagocitosis se ha expandido completamente y existen numerosas estructuras elevadas intermedias (como “babosas”, “dedos”, etc.) con aparición de algunos cuerpos fructíferos, cuya presencia junto a la de soros se torna mayoritaria en la fase de culminación consolidada (3,5 puntos).

Los puntajes asignados a cada una de las imágenes se analizaron estadísticamente a través de una prueba ANOVA de dos colas, seguida de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Las diferencias detectadas se definieron como significativas según un valor $P < 0,05$, basándose en un intervalo de confianza mínimo del 95%. El procesamiento gráfico y estadístico de los datos se efectuó mediante *GraphPad Prism 9.0* (ver **Sección 10.13.2**).

10.15.- Distribución subcelular de la proteína Rab32A en *D. discoideum*

El patrón de distribución subcelular de la GTPasa monomérica Rab32A se evaluó mediante microscopía confocal en *D. discoideum* sin infectar e infectado con la cepa silvestre y las diferentes mutantes de *S. Typhimurium*. Para esto, se generaron linajes celulares de la ameba que expresan una proteína Rab32A fusionada en su región N- o C-terminal al reportero fluorescente GFP (**Tabla 4**). Paralelamente, las cepas bacterianas se transformaron con un plasmidio que permite la expresión constitutiva de la proteína fluorescente mCherry (**Tabla 1**).

10.15.1.- Generación de la proteína Rab32A fusionada en su extremo C-terminal al reportero GFP

La secuencia codificante del gen *rab32A* (*dictyBase*: DDB_G0283603) de *D. discoideum*, se amplificó mediante PCR desde una librería de cDNA de la ameba, la cual fue generada por el grupo del Dr. Ricardo Escalante (Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CSIC/UAM) a partir de una mezcla de mRNA aislado desde células en crecimiento y células sometidas a privación de nutrientes durante 4 h (Mesquita *et al.*, 2015). La amplificación por PCR se realizó utilizando la polimerasa de alta fidelidad *Phusion* (NEB) (ver **Sección 10.12**) y los partidores específicos *5rab32A_pDM1045* y *3rab32A_pDM1045* (**Tabla 3**).

El producto de PCR se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% en solución amortiguadora TAE 1x y tinción con GelRed 1x. La corrida electroforética se efectuó a 100 V durante 35 min. Posterior a la verificación de su tamaño

(~677 pb), el amplicón se purificó desde la banda del gel mediante el sistema comercial “QIAquick Gel Extraction Kit” (QIAGEN), según las instrucciones del fabricante. Para su enriquecimiento, el fragmento purificado se usó como DNA molde en una segunda ronda de amplificación por PCR, análisis por electroforesis y purificación, siguiendo el mismo procedimiento recién descrito.

El amplicón de *rab32A* se sometió a una reacción de *A-tailing* (ver **Sección 10.12**) previo a su purificación desde el gel y luego se clonó en el vector comercial pGEM-T (Promega), conforme las indicaciones del fabricante. Luego, se efectuó la ligación de *rab32A* como DNA inserto en el vector y una alícuota de la reacción se transformó en la cepa comercial quimiocompetente de *E. coli* “One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli*” (Invitrogen). Las bacterias transformantes se seleccionaron sembrando en agar LB suplementado con Amp, IPTG 0,5 mM y X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) 80 µg/mL para su incubación a 37°C durante 24 h. El vector pGEM-T es provisto como una molécula de DNA lineal, dónde el marco de lectura del gen *lacZ* se encuentra interrumpido. Si la ligación del DNA inserto es exitosa, el gen *lacZ* permanece interrumpido y la actividad β-galactosidasa que codifica no se reconstituye. De este modo, se escogieron aleatoriamente colonias bacterianas resistentes a Amp y de un color blanco, indicando la ausencia de la actividad β-galactosidasa. En estas colonias, la presencia del plasmidio recombinante pGEM::*rab32A* (**Tabla 2**) se confirmó mediante PCR (ver **Sección 10.9.4**) con los partidores *5rab32A_pDM1045* y *3rab32A_pDM1045*. Posteriormente, el DNA plasmidial se purificó mediante el sistema “QIAprep Spin Miniprep kit” (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los partidores *5rab32A_pDM1045* y *3rab32A_pDM1045* se diseñaron para el clonamiento del gen *rab32A* en el plasmidio pDM1045 (**Tabla 2**), el cual confiere resistencia a Amp como marcador de selección procarionte y contiene un marco de

lectura que codifica a la proteína fluorescente de GFP. Inmediatamente río arriba del marco de lectura de GFP, el plasmidio cuenta con un sitio de inserción flanqueado por secuencias de corte para las endonucleasas *Bgl*II/*Spe*I, permitiendo generar una fusión génica C-terminal al reportero fluorescente. Esta fusión génica se expresa constitutivamente al encontrarse bajo el control del promotor eucarionte de Actina 15 presente en el plasmidio (Veltman *et al.*, 2009a). Durante la amplificación por PCR del marco de lectura de *rab32A* para su clonamiento inicial en el vector pGEM-T, se incorporó en el extremo 5' del amplicón mediante el partidor 5*rab32A*_pDM1045 un sitio de corte para la endonucleasa *Bgl*II y la secuencia Kozak AAAA específica para el inicio de la traducción en *D. discoideum* (Veltman *et al.*, 2009a). Asimismo, en el extremo 3' del fragmento amplificado se incorporó un sitio de corte para *Xba*I (isoesquizómero de la enzima *Spe*I) y se eliminó el codón de término nativo de *rab32A* a través del partidor 3*rab32A*_pDM1045. La ausencia de mutaciones en la secuencia del marco de lectura de *rab32A* clonado en el plasmidio pGEM::*rab32A* se confirmó mediante secuenciación (ver **Sección 10.17**). Este plasmidio se sometió a una doble digestión enzimática con las endonucleasas *Bgl*II y *Xba*I (Thermo Scientific) para escindir el marco de lectura de *rab32A*, cuya liberación se analizó por electroforesis en gel de agarosa y se purificó desde banda mediante el sistema comercial “*QIAquick Gel Extraction Kit*” (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. Por otro lado, el plasmidio pDM1045 también se digirió enzimáticamente en una reacción doble con las enzimas *Bgl*II y *Bcu*I (*Spe*I) (Thermo Scientific). La linealización del plasmidio se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa para su consiguiente purificación desde el gel con el sistema comercial “*QIAquick Gel Extraction Kit*” (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. El marco de lectura de *rab32A* digerido se ligó con el plasmidio pDM1045 linealizado, utilizando la enzima T4 DNA ligasa (NEB) de acuerdo al protocolo del fabricante. La

ligación se transformó en la cepa comercial quimiocompetente de *E. coli* “One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli*” (Invitrogen). Las bacterias transformantes se seleccionaron sembrando en agar LB suplementado con Amp e incubación a 37°C durante 24 h. La presencia del plasmidio recombinante pDM1045::*rab32A* (**Tabla 2**) se confirmó mediante PCR (ver **Sección 10.9.4**) empleando las parejas de partidores pDM1045_Dir/pDM1045_Rev y pDM1045_Dir/3*rab32A*_pDM1045 (**Tabla 3**) para determinar la inserción y la orientación del marco de lectura de *rab32A*, respectivamente. Algunas de las colonias transformantes de *E. coli*, con una amplificación positiva en el PCR, se cultivaron en caldo LB suplementado con Amp a 37°C durante 24 h para la extracción del plasmidio recombinante (ver **Sección 10.8**). Para confirmar que no se incorporaron mutaciones adicionales en el marco de lectura de *rab32A* el plasmidio pDM1045::*rab32A* se analizó mediante secuenciación (ver **Sección 10.17**).

10.15.2.- Generación de la proteína Rab32A fusionada en su extremo N-terminal al reportero GFP

La fusión génica para producir la proteína Rab32A acoplada en su extremo N-terminal al reportero fluorescente GFP, se generó a través del mismo procedimiento descrito para su contraparte C-terminal (ver **Sección 10.15.1**), con algunas variaciones. El marco de lectura de *rab32A* se amplificó mediante PCR desde el plasmidio recombinante pGEM::*rab32A* como DNA molde, utilizando los partidores 5*rab32A*_pDM334 y 3*rab32A*_pDM334 (**Tabla 3**) diseñados para el clonamiento en el plasmidio pDM334 (**Tabla 2**). El partidor 5*rab32A*_pDM334 cuenta con un sitio de corte para la endonucleasa *Bgl*II, mientras que el partidor 3*rab32A*_pDM334 contiene un sitio para el corte por *Xba*I y además, incorpora el codón de término nativo del gen *rab32A*

(ausente en el marco de lectura clonado en pGEM::*rab32A*) para detener la traducción de la proteína de fusión generada al clonar en el plasmidio pDM334. Este plasmidio confiere resistencia a Amp como marcador de selección procarionte y presenta un sitio de inserción con secuencias de corte para las endonucleasas *Bgl*II y *Spe*I, el cual se encuentra inmediatamente río abajo del marco de lectura que codifica a la proteína fluorescente GFP. Esto permite generar una fusión N-terminal al reportero GFP, cuya expresión es dependiente de un promotor eucarionte inducible por doxiciclina (Dox) (Veltman *et al.*, 2009b).

10.15.3.- Transformación de *D. discoideum* con DNA plasmidial

Las distintas construcciones plasmidiales (pDM334::*rab32A* y pDM1045::*rab32A*) generadas para expresar la proteína Rab32A como fusión al reportero GFP, se transformaron mediante electroporación en amebas del linaje AX4 de *D. discoideum*, según un protocolo descrito previamente en la literatura (Weber *et al.*, 2014), con ciertas modificaciones. Brevemente, cuando las amebas alcanzaron una confluencia celular de 90% o superior ($\sim 4 \times 10^7$ células totales) a partir de su tercer subcultivo en medio HL5 en botellas de cultivo T75 (ver **Sección 10.6**), se lavaron una vez con 10 mL de solución amortiguadora de electroporación HG-50 1x (HEPES 4,77 g/L, NaCl 0,58 g/L, KCl 3,73 g/L, MgSO₄ 0,25 g/L, Na₂CO₃ 0,53 g/L, NaH₂PO₄ 0,14 g/L; pH 7,0) enfriada a 4°C y luego se desprendieron mecánicamente para su resuspensión en 4 mL de la misma solución. Un alícuota de 1 mL de la suspensión de amebas en HG-50 ($\sim 10^7$ células totales) se mezcló con 3–5 µg de DNA plasmidial y se incubó durante 15 min en hielo. Posteriormente, la mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 1 mm (de separación entre sus electrodos) enfriada a -20°C y se aplicaron, con un intervalo de

pausa de 5 seg, 2 pulsos de un voltaje de 0,85 KV, una resistencia de 200 Ω y una capacitancia de 25 μ F en un equipo *Gene Pulser* (Bio-Rad) acoplado a una unidad *Pulse Controller* y a un *Capacitance Extender* (Bio-Rad). El contenido de la cubera se transfirió a una botella de cultivo celular T25 con 4 mL de medio HL5 suplementado con Amp para permitir la recuperación no restrictiva de las amebas incubando a 22°C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se incorporó G418 10 μ g/mL o Hyg 50 μ g/mL como antibiótico eucarionte para iniciar la selección de las amebas transformantes con el plasmidio recombinante pDM334::*rab32A* o pDM1045::*rab32A*, respectivamente. A contar de este momento, el cultivo se monitoreó periódicamente cada 24 h, realizando un cambio de medio de cultivo sólo ante la acumulación de células muertas en suspensión para evitar el estrés excesivo de las amebas viables adheridas al fondo de la botella. Cuando la confluencia del cultivo alcanzó el ~90%, lo cual puede tardar de 2 a 4 semanas de acuerdo la eficiencia de la transformación, se efectuó el primer subcultivo hacia una botella T75 con 10 mL de HL5, manteniendo la suplementación con Amp y la selección con el antibiótico eucarionte correspondiente. Los subcultivos siguientes en botellas T75 se realizaron siempre cuando la confluencia del cultivo fue igual o mayor al 90%. En el tercer subcultivo, la expresión fenotípica de la proteína de fusión se evaluó mediante la emisión de fluorescencia por parte de las amebas transformantes. La fluorescencia se visualizó directamente en los cultivos de amebas a través de un equipo de epifluorescencia *Zoe Fluorescent Cell Imager* (Bio-Rad). En las amebas transformadas con el plasmidio pDM334::*rab32A*, la visualización requirió de una inducción previa con Dox 10 μ g/mL durante al menos 4 h. A modo de control, también se generaron linajes de *D. discoideum* transformados con los respectivos vectores pDM334 y pDM1045 vacíos.

10.15.4.- Generación de cepas bacterianas fluorescentes

La cepa silvestre y la doble mutante $\Delta gtgE \Delta sopD2$ de *S. Typhimurium* 14028s se transformaron mediante electroporación (ver **Sección 10.9.2**) con el plasmidio pFCcGi (**Tabla 2**), el cual confiere resistencia a Amp como marcador de selección y expresa constitutivamente la proteína fluorescente roja mCherry. Adicionalmente, también se transformó a *Escherichia coli* B/r (**Tabla 1**) con el plasmidio pFCcGi para generar un control de internalización, al ser una cepa bacteriana no patógena para *D. discoideum*, la cual normalmente es fagocitada y degradada por la ameba (Riquelme *et al.*, 2016).

10.15.5.- Ensayo de infección analizado mediante microscopía confocal

Las cepas de *S. Typhimurium* 14028s transformadas para expresar la proteína fluorescente mCherry, se utilizaron para infectar a las amebas de los linajes transformantes de *D. discoideum* que expresan la proteína Rab32A fusionada en su extremo N- o C-terminal a GFP, cuya distribución subcelular se evaluó mediante microscopía confocal (**Fig. 5**).

El día anterior a la infección, amebas de los linajes transformantes provenientes de un cultivo en botella T75 a una confluencia celular igual o mayor a 90%, se sembraron en medio HL5 suplementando con Amp y G418 o Hyg (según corresponda al marcador de selección eucarionte de cada plasmidio) a una densidad de $\sim 2 \times 10^5$ células/pocillo ($\sim 200 \mu\text{L}$) en una placa de microscopía de 8 pocillos (Ibidi). La placa se incubó a 22°C durante 24 h para permitir la adherencia de las amebas.

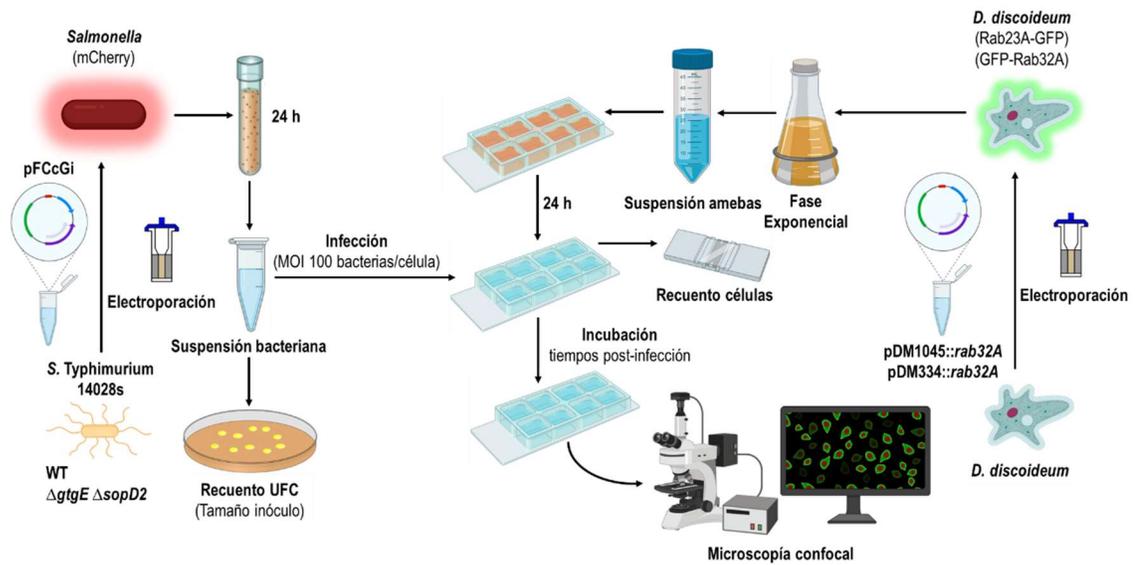


Figura 5. Ensayo de infección de *S. Typhimurium* en *D. discoideum* monitoreado mediante microscopía confocal. Un linaje transformante de *D. discoideum*, generado para expresar ectópicamente la proteína Rab32A como una fusión N- o C-terminal al reportero GFP desde un plasmidio recombinante, se infectó con la cepa silvestre o la doble mutante $\Delta gtgE \Delta sopD2$ de *S. Typhimurium* 14028s transformadas con un plasmidio que permite expresar la proteína fluorescente mCherry. La distribución subcelular de ambas fusiones de Ra32A a GFP se monitoreó independientemente a través de microscopía confocal en amebas sin infectar o infectadas con las cepas de *S. Typhimurium*.

Por otro lado, las cepas bacterianas se cultivaron en 3 mL de caldo LB suplementado con Amp durante 24 h a 37°C sin agitación. Al siguiente día, las amebas no adheridas a la placa se removieron mediante 1 lavado con solución amortiguadora Sørensen 1x estéril. En uno de los pocillos de la placa, las amebas se desprendieron por resuspensión energética con 200 μ L de solución amortiguadora Sørensen 1x para determinar el número células viables mediante recuento en cámara de Neubauer con tinción de azul de tripán. En el caso del linaje de *D. discoideum* transformado con el plasmidio recombinante pDM334::rab32A, la expresión de la proteína de fusión GFP-Rab32A se indujo por exposición a Dox 10 μ g/mL durante 4 h en medio HL5 (no suplementado con Amp, ni con G418). Transcurrido el tiempo de inducción, las amebas se lavaron con solución amortiguadora Sørensen 1x y se infectaron a una MOI de 100 bacterias/ameba mediante co-incubación durante 1 h a 22°C con 200 μ L de una suspensión bacteriana de las

distintas cepas. Previamente, cada suspensión bacteriana se preparó en solución amortiguadora Sørensen 1x a partir de una alícuota de 1 mL del respectivo cultivo bacteriano, cuya biomasa se sedimentó por centrifugación a $18.300 \times g$ durante 2 min y se sometió a 3 lavados con 1 mL de solución amortiguadora Sørensen 1x, centrifugando cada vez y resuspendiendo en un volumen final de 1 mL de la solución amortiguadora. Desde esta alícuota de 1 mL de bacterias en solución amortiguadora Sørensen 1x se recolectó un volumen que, según la curva de crecimiento específica de cada cepa, contenía el número de UFC suficiente para preparar una suspensión cuya carga bacteriana por cada 200 μL fuera 100 veces mayor al número promedio de amebas en cada pocillo. El volumen final de cada suspensión bacteriana se estimó multiplicando 200 μL por el número total de pocillos a infectar con cada cepa, sumando un pocillo adicional como exceso. Para determinar la MOI real, el número de bacterias viables en cada suspensión se cuantificó por dilución seriada en PBS 1x (10^0 – 10^{-7}) y recuento de UFC en agar LB con incubación a 37°C durante 24 h. Las bacterias extracelulares que no fueron internalizadas tras completado el tiempo de infección de la amebas, se eliminaron mediante una incubación con solución amortiguadora Sørensen 1x suplementado con Gm 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 5 min, seguido de 2 lavados con solución amortiguadora Sørensen 1x sin antibiótico. A distintos tiempo, la presencia de bacterias intracelulares y/o la distribución subcelular de GFP-Rab32A en amebas sin infectar o infectadas con las diferentes cepas bacterianas, se monitoreó mediante la adquisición de imágenes con un microscopio confocal de escaneo láser Zeiss LSM 700 equipado con un objetivo 100x en aumento 0,5x. Las imágenes se procesaron utilizando el programa *Image J 1.52a* (*National Institutes of Health*).

El linaje de *D. discoideum* transformado con el plasmidio recombinante pDM1045::*rab32A*, el cual expresa la proteína de fusión C-terminal Rab32A-GFP, se

analizó siguiendo el mismo procedimiento ya descrito. Sin embargo, cómo la expresión de la proteína Rab32A-GFP es constitutiva, no se requiere de una inducción previa y la infección de las amebas con las distintas cepas de *S. Typhimurium* se realizó directamente.

10.16.- Actividad proteolítica del efector GtgE de *S. Typhimurium* sobre la proteína Rab32A de *D. discoideum*

Para evaluar la proteólisis de la GTPasa monomérica Rab32A de *D. discoideum* por parte del efector GtgE de *S. Typhimurium* 14028s, se generaron cepas recombinantes de *E. coli* (**Tabla 1**) co-transformadas con construcciones plasmidiales compatibles (**Tabla 2**) para expresar heterológamente a Rab32A como una proteína de fusión C-terminal al epítipo 6xHis (Rab32A-6xHis), junto a GtgE silvestre o una versión mutante del efector sin actividad catalítica (GtgE^{H151A}). En lisados bacterianos totales de estas cepas de *E. coli*, se analizó la proteólisis de Rab32A-6xHis mediante *SDS-PAGE* y *Western blot* utilizando anticuerpo comerciales específicos (**Fig. 6**).

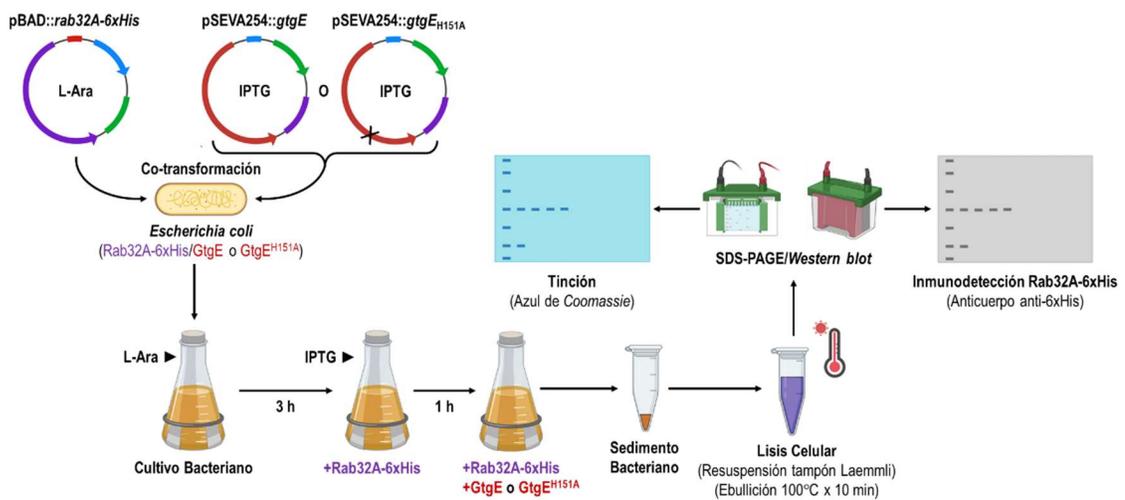


Figura 6. Ensayo para evaluar la actividad proteolítica del efector GtgE de *S. Typhimurium* sobre la proteína Ra32A de *D. discoideum*. Una cepa de *E. coli* se co-transformó con construcciones plasmidiales que permiten expresar heterológamente al efector GtgE silvestre de *S. Typhimurium* o su contraparte mutante sin actividad catalítica (GtgE^{H151A}), junto a la proteína Rab32A de *D. discoideum* como una fusión C-terminal al epítipo 6xHis. La proteólisis de la GTPasa se analizó mediante SDS-PAGE y *Western blot* en lisados bacterianos totales de la cepa recombinante de *E. coli*.

10.16.1.- Generación de las construcciones plasmidiales para la co-expresión de la proteína Rab32A y el efector GtgE

El marco de lectura que codifica a Rab32A se amplificó mediante PCR (ver **Sección 10.12**) a partir del plasmidio pGEM::*rab32A* (**Tabla 2**) como DNA molde, utilizando la DNA polimerasa de alta fidelidad *Phusion* (NEB) y los partidores *rab32A_ORF5* y *rab32A_6xHis3* (**Tabla 3**). El partidador *rab32A_6xHis3* hibrida en el extremo 3' de la secuencia codificante de *rab32A*, omitiendo su codón de término nativo e incorporando codones adicionales que codifican un espaciador de glicinas (G-S-G-S) seguido por el epítipo 6xHis. Esto permite generar una fusión C-terminal de la proteína Rab3A al epítipo 6xHis. El fragmento de DNA amplificado (*rab32A-6xHis*) se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa, se purificó desde el gel mediante el sistema comercial “*QIAquick Gel Extraction Kit*” (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del

fabricante y se sometió a una reacción de *A-tailing* (ver **Sección 10.12**) para su posterior clonamiento en el vector comercial “*pBAD TOPOTM TA Expression Kit*” (Invitrogen), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Este vector confiere resistencia a Amp y contiene un promotor inducible por L-arabinosa (*P_{araBAD}*) río arriba del sitio de clonamiento. La reacción de ligación entre el amplicón *rab32A-6xHis* y el vector pBAD-TOPO, se transformó en la cepa comercial quimiocompetente de *E. coli* “*One ShotTM TOP10 Chemically Competent E. coli*” (Invitrogen), según las indicaciones del fabricante. Las bacterias transformantes se seleccionaron sembrando en agar LB suplementado con Amp e incubando a 37°C durante 24 h. La presencia del plasmidio recombinante pBAD::*rab32A-6xHis* (**Tabla 2**) en las colonias se verificó por PCR (ver **Sección 10.9.4**). Considerando que el vector pBAD-TOPO es provisto como una molécula lineal, la reacción de ligación durante el clonamiento puede originar plasmidios en que el fragmento de interés se haya insertado a favor o en contra del sentido del promotor *P_{araBAD}*. La incorporación del inserto y su orientación se determinaron mediante PCR utilizando las parejas de partidores (**Tabla 3**) pBAD-Fw/pBAD-Rev2 y pBAD-Fw/*rab32A_6xHis3*, respectivamente. La combinación de partidores pBAD-Fw/*rab32A_6xHis3* produce una amplificación únicamente si el fragmento clonado está orientado a favor del promotor inducible. Algunas de las transformantes de *E. coli* con una amplificación positiva en el PCR de colonia, se cultivaron en caldo LB suplementado con Amp a 37°C durante 24 h para la extracción de su DNA plasmidial (ver **Sección 10.8**) y posterior análisis mediante secuenciación (ver **Sección 10.17**). Uno de los clones transformantes de *E. coli* (TOP10/pBAD::*rab32A*; **Tabla 1**), cuyo plasmidio recombinante se confirmó vía secuenciación, se transformó mediante electroporación (ver **Sección 10.9.2**) con un segundo plasmidio. Según el caso, este plasmidio se generó a partir del clonamiento independiente del marco de lectura de *gtgE* silvestre o de una

variante mutante sin actividad catalítica (*gtgE*_{H151A}) en el vector pSEVA254 (**Tabla 3**). Este vector confiere resistencia a Kan y porta un promotor inducible por IPTG río arriba del sitio de inserción. Para el clonamiento, el alelo silvestre de *gtgE* se amplificó por PCR (ver **Sección 10.9.1**) a partir de DNA genómico de *S. Typhimurium* 14028s (ver **Sección 10.7**), utilizando la DNA polimerasa de alta fidelidad *Phusion* (NEB) (ver **Sección 10.12**) y los partidores *gtgE_pSEVA5* y *gtgE_pSEVA3* (**Tabla 3**). Estos partidores hibridan en los extremos del marco de lectura de *gtgE* y contienen en su secuencia sitios de corte para las endonucleasas *EcoRI* (*gtgE_pSEVA5*) y *XbaI* (*gtgE_pSEVA3*). Adicionalmente, el partidador *gtgE_pSEVA5* incorpora un sitio de unión al ribosoma (TTAACTTTAAGAAGGAG) para la traducción del transcrito derivado del marco de lectura. La amplificación de *gtgE* se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% en solución amortiguadora TAE 1x y tinción con GelRed 1x, efectuando la corrida electroforética a 100 V durante 35 min. Tras verificar su tamaño (~732 pb), el producto de PCR se purificó mediante el sistema comercial “*QIAquick PCR Purification Kit*” (QIAGEN), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El amplicón purificado se sometió a una doble digestión enzimática con las endonucleasas *EcoRI* y *XbaI* (Thermo Scientific). Por su parte, el plasmidio pSEVA524 purificado (ver **Sección 10.8**) también se digirió enzimáticamente con las mismas endonucleasas para su linealización. La digestión del amplicón *gtgE* y del plasmidio se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa para su consiguiente purificación desde el gel con el sistema comercial “*QIAquick Gel Extraction Kit*” (QIAGEN), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El marco de lectura de *gtgE* digerido se ligó con el plasmidio pSEVA254 linealizado mediante una reacción con la enzima T4 DNA ligasa (NEB), de acuerdo al protocolo del fabricante. La ligación se transformó en la cepa comercial quimiocompetente de *E. coli* “*One Shot™ TOP10 Chemically Competent E. coli*” (Invitrogen) y las bacterias

transformantes se seleccionaron sembrando en agar LB suplementado con Amp e incubación a 37°C durante 24 h. La transformación con el plasmidio recombinante pSEVA::*gtgE* (**Tabla 2**) se confirmó mediante PCR (ver **Sección 10.9.4**) empleando las parejas de partidores pSEVA_F/pSEVA_R y pSEVA_F/*gtgE*_pSEVA3 (**Tabla 3**) para determinar la presencia y la orientación del inserto, respectivamente. Algunas de las colonias transformantes de *E. coli* que presentaron una amplificación positiva en el PCR, se cultivaron en caldo LB suplementado con Amp a 37°C durante 24 h para la extracción del plasmidio recombinante (ver **Sección 10.8**).

El clonamiento del alelo mutante catalítico *gtgE*_{H151A} se realizó mediante el mismo procedimiento descrito para el gen *gtgE* silvestre. No obstante, en la secuencia nucleotídica del alelo mutante, el triplete CAT de la posición 451-453 se reemplazó por GCA, lo que constituye un cambio codogénico que a nivel de proteína conduce a la sustitución del residuo de histidina 151 por alanina. El residuo de histidina 151 conforma parte del motivo catalítico de GtgE (triada C-H-G) (Watchel *et al.*, 2018) y su mutación elimina la actividad cisteína proteasa del efector (Spanò *et al.*, 2011). El marco de lectura de *gtgE*_{H151A} se generó mediante síntesis química, utilizando el servicio “*Gene Synthesis & Dna Synthesis Services*” de GENEWIZ® (Azenta Life Sciences). La secuencia de *gtgE*_{H151A} se proporcionó como inserto en vector plasmidial derivado del pUC19, desde el cual se amplificó vía PCR para su clonamiento en pSEVA254. Los plasmidios recombinantes pSEVA254::*gtgE* y pSEVA254::*gtgE*_{H151A} se transformaron independientemente mediante electroporación (ver **Sección 10.9.2**) en la cepa receptora de *E. coli* previamente transformada con el plasmidio pBAD::*rab32A-6xHis* (**Tabla 1**). Las bacterias co-transformantes se seleccionaron sembrando en agar LB suplementado con Amp/Kan e incubación a 37°C durante 24 h. La presencia de ambos plasmidios recombinantes se determinó mediante PCR (ver **Sección 10.9.4**) con las parejas de

partidores pBAD-Fw/*rab32A*_6xHis3 y pSEVA_F/*gtgE*_pSEVA3. Como control, la cepa *E. coli* TOP10/pBAD::*rab32A* también se transformó con el vector pSEVA254 vacío.

10.16.2.- Co-expresión heteróloga de la proteína de fusión Rab32A-6xHis y del efector GtgE en una cepa recombinante de *E. coli*

Las cepas recombinantes co-transformadas de *E. coli* se inocularon en duplicado con una proporción de 1:100 en 10 mL de caldo LB suplementado con 10 mM de L-Ara y Amp o Amp/Kan, según fue necesario. Los cultivos se incubaron a 37°C con agitación durante 3 h y la suplementación con L-Ara se utilizó para inducir la expresión de la proteína Ra32A-6xHis en todas las cepas desde un comienzo. Transcurridas las 3 h, una de las dos réplicas de cada cepa transformada con el plasmidio pSEVA254 o sus derivados (**Tabla 2**), se indujeron con 1 mM de IPTG durante 1 h a 37°C con agitación para la expresión del efector GtgE silvestre o su contraparte mutante GtgE^{H151A}. La réplica restante de las cepas se mantuvo en incubación sin inducción con IPTG durante el mismo tiempo como control. Adicionalmente, una cepa de *E. coli* transformada sólo con el plásmido pBAD::*rab32A*-6xHis, se creció en un medio con presencia de L-Ara para inducir la expresión de la proteína Rab32A-6xHis o en un medio suplementado con o de L-glucosa 0.2% para reprimirla catabólicamente. Completadas 4 h totales, la biomasa equivalente a 5 mL de cultivo de todas las cepas bacterianas se sedimentó mediante centrifugación a 5.350 x g durante 10 min a 4°C y el sobrenadante se eliminó por inversión. Los sedimentos bacterianos se procesaron inmediatamente para su análisis mediante SDS-PAGE y Western blot.

10.16.3.- Inmunodetección de la proteólisis de Rab32A-6xHis en lisados bacterianos totales

Los sedimentos bacterianos, provenientes de las distintas cepas recombinantes de *E. coli* (ver **Sección 10.16.2**), se lisaron mediante la resuspensión en tampón de muestra Laemmli 1x (Bio-Rad) suplementado con 10% β -mercaptoetanol en una proporción de 10 μ L/mg de sedimento húmedo. Para completar la lisis, las muestras se sometieron a ebullición a 100°C durante 10 min en un baño de agua. Los lisados bacterianos totales se resolvieron mediante *SDS-PAGE* cargando paralelamente un volumen de 3 μ L en dos geles de poliacrilamida al 12%, usando el sistema de electroforesis en geles *Mini-Protean III* (Bio-Rad). La corrida electroforética se realizó en tampón de corrida 1x (glicina 1,44%, Tris 0,3%, SDS 0,1%) a 50 V durante 1 h (o hasta que las muestras superaron el gel concentrador) y luego a 100 V durante 3 h (o hasta la caída del frente de corrida desde el gel). Las proteínas se movilizaron desde uno de los geles hacia una membrana PVDF *Inmovilon-P* (Millipore) mediante electrotransferencia húmeda en sistema *Mini Trans-Blot* (Bio-Rad). Para esto, la membrana se activó previamente por inmersión en metanol (MetOH) 100% durante 30 seg y la transferencia se realizó a 300 mA durante 90 min en tampón de transferencia (Tris 0,3%, glicina 1,44%; MetOH 20%). Finalizada la transferencia, la membrana se lavó en tampón TBS-T (Tris-Base 50 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%) y se bloqueó mediante incubación en una solución de albúmina de suero bovino (BSA; Winkler) 5% en TBS-T durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Tras el bloqueo, la membrana se incubó con un anticuerpo primario de ratón anti-6xHis (ab18184, abcam) en dilución 1:5.000 en BSA 5% en TBS-T a 4°C sin agitación durante 24 h. Luego de ese tiempo, la membrana se lavó 3 veces con abundante TBS-T y agitación enérgica durante 10 min, para después

incubarse con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (immunoPure Antibody #31430; Thermo Scientific) en dilución 1:10.000 en BSA 5% en TBS-T durante 2 h con agitación a temperatura ambiente. La membrana se sometió nuevamente a 3 lavados de 10 min con abundante TBS-T y agitación enérgica. Para la inmunodetección de las proteínas en la membrana, se usó el sistema comercial *Supersignal West-Femto* (Pierce Biotechnology, Inc), según las indicaciones del fabricante. Este sistema consta de un reactivo que al ser oxidado por la HRP emite una señal quimioluminiscente. La detección de esta señal y la captura de las imágenes se efectuaron mediante el equipo *Dyversity 4* (Syngene). La membrana se recuperó y se almacenó en TBS-T a 4°C.

Para la visualización directa de las proteínas totales en la muestras, el gel restante se sometió a tinción mediante incubación con azul de *Coomassie* (1 g de *Coomassie Brilliant Blue G-20* (Thermo Scientific) disuelto en una solución acuosa de MetOH 50% y ácido acético 10%) durante 1 h con agitación. La destinción posterior se efectuó mediante 3 lavados de 10 min con una solución de ácido acético 10% en agitación suave, seguida de una incubación de 16 h en la misma solución a temperatura ambiente y con agitación. El gel se observó en un transiluminador de luz visible *Gold-SIM* (*SIM international Group*) y su registro fotográfico se realizó con un fotodocumentador *microDOC* (*Cleaver Scientific Ltda.*). El gel se almacenó inmerso en agua Mili-Q a 4°C.

10.17.- Análisis de plasmidios recombinantes mediante secuenciación

La fidelidad de secuencia de las distintas construcciones plasmidiales generadas en este trabajo (**Tabla 2**), se verificaron a través de secuenciación capilar de DNA en un equipo ABI PRISM 3500 xl *Applied Biosystems* (Servicio de Secuenciación Automatizada de ADN, Pontificia Universidad Católica de Chile). Los resultados de secuenciación se analizaron *in silico* mediante alineamiento con secuencias de referencia en el programa Vector NTI 10.3 (Thermo Scientific).

10.18.- Análisis bioinformáticos basados en secuencia

A través de una búsqueda en la plataforma *dictyBase* (<http://dictybase.org/>), se identificaron 4 *loci* en el genoma de *D. discoideum* anotados como marcos de lectura que codifican proteínas Rab32 (Rab32A–D). Las secuencias aminoacídicas de estas 4 proteínas se alinearon con las secuencias de proteínas Rab32 y otras filogenéticamente emparentadas, todas de origen mamífero. En estas proteínas de mamífero, la actividad proteolítica del efector GtgE de *S. Typhimurium* se ha confirmado experimentalmente (Spanò & Galán, 2012). El alineamiento de las secuencias se realizó utilizando la plataforma *T-Coffee* en su modalidad *Expresso* (Di Tommaso *et al.*, 2011) y las secuencias de todas la proteínas analizadas se obtuvieron desde la base de datos integrada *KEGG Pathway Database* (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Adicionalmente, para una comparación más exhaustiva, la secuencia de la proteína Rab32A de *D. discoideum* se alineó sólo contra la secuencia de la proteína Rab32 humana a través del *software SanpGene 7.2* (Dotmatics).

Por otro lado, se generó un cladograma que incluyó la secuencia de aminoácidos de las 4 proteínas Rab32 de *D. discoideum* y la secuencia de otras 52 proteínas Rab de distintos organismos, donde se abarcó a las GTPasas asociadas filogenéticamente a Rab32A durante su caracterización inicial (Norian et al, 1999) y a un conjunto de otras secuencias identificadas mediante la herramienta BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) tras una ronda de búsqueda usando a Rab32A como referencia. El análisis de las secuencias se efectuó con el *software* MEGA 11 mediante el método de Máxima Probabilidad/Verosimilitud (*Maximun Likelihood*) con un *Bootstrapping* de 4.000 repeticiones.

11.- RESULTADOS

11.1.- Las proteínas Rab32 de *D. discoideum* comparten una alta similitud de secuencia y residuos clave con proteínas Rab32 de mamífero

El genoma de *D. discoideum* codifica 4 proteínas homólogas a Rab32 (Rab32A–D), de las cuales Rab32A es la única detectada experimentalmente como parte del proteoma asociado a fagosomas en la ameba (Gotthardt *et al.*, 2006) y pertenece al 41,7% de proteínas fagosómicas que este organismo comparte con macrófagos murinos (Boulais *et al.*, 2010). Además, tal como ocurre con Rab32 en macrófagos, Rab32A también es reclutada hacia la LCV durante la infección por *Legionella pneumophilla* en *D. discoideum* (Hoffmann *et al.*, 2014; Schmolders *et al.*, 2017). En esta ameba, Rab32A fue identificada como un homólogo de las proteínas Rab29, Rab32 y Rab38 humanas, y Rab29 de rata (Norian *et al.*, 1999). Utilizando la base de datos *dictyBase* (<http://dictybase.org/>), se localizó los 4 *loci* anotados como marcos de lectura que codifican proteínas homólogas a Rab32 en el genoma de *D. discoideum*. La secuencia aminoacídica correspondiente a cada una de estas proteínas se obtuvo desde la base de datos KEGG *Pathway* (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) y se alineó contra las proteínas humanas Rab29, Rab32 y Rab38, usando la plataforma *T-Coffee: Expresso* (Di Tommaso *et al.*, 2011). En este alineamiento también se incluyó a proteínas Rab32 provenientes de otros mamíferos, donde también se ha observado la proteólisis *in vitro* por parte de GtgE. El análisis mostró que las 4 proteínas Rab32 de *D. discoideum* comparten una alta similitud de secuencia con sus contrapartes de humano, ratón y mono verde africano (**Fig. 7A**). Particularmente, Rab32A de *D. discoideum* tiene 59,4% de identidad y 78,3% de similitud con Rab32 de origen humano (**Fig. 7B**). Asimismo, el

motivo de secuencia T-I/V-G-V-A-D-F, definido experimentalmente como sitio de corte para GtgE en Rab29, Rab32 y Rab38 de origen humano (Spanò & Galán, 2012), está conservado en todas las proteínas Rab32 de la ameba (**Fig. 7A**). Esta observación *in silico*, sugiere que las 4 proteínas Rab32 de *D. discoideum* son blancos potenciales de la actividad proteolítica del efector GtgE de *S. Typhimurium*.

En paralelo, se efectuó un análisis filogenético (ver **Sección 10.18**) en que se incorporó la secuencia aminoacídica de las 4 proteínas Rab32 de *D. discoideum*, la secuencia de las proteínas Rab establecidas como homólogas a Rab32A durante su caracterización inicial (Norian *et al.*, 1999) y un conjunto de secuencias obtenidas tras una ronda de búsqueda con la herramienta BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), usando a Rab32A como referencia. El cladograma generado con el *software* MEGA 11 mediante el método de Máxima Probabilidad/Verosimilitud (*Maximun Likelihood*), arrojó que Rab32A de *D. discoideum* no se agrupa en el mismo clado junto con las otras proteínas Rab32 de la ameba y que presenta una mayor cercanía filogenética con proteínas Rab de origen mamífero (**Fig. 8**). Esto concuerda con evidencia que indica que Rab32A de organismos más primitivos como *D. discoideum*, habría derivado evolutivamente en la proteína Rab32 presente en organismos eucariontes más recientes (Ortiz-Sandoval *et al.*, 2014). En contraposición, Rab32B habría sido reemplazada por Rab38 y que tanto Rab32C como Rab32D, se encontrarían sólo en eucariontes ancestrales (Ortiz-Sandoval *et al.*, 2014).

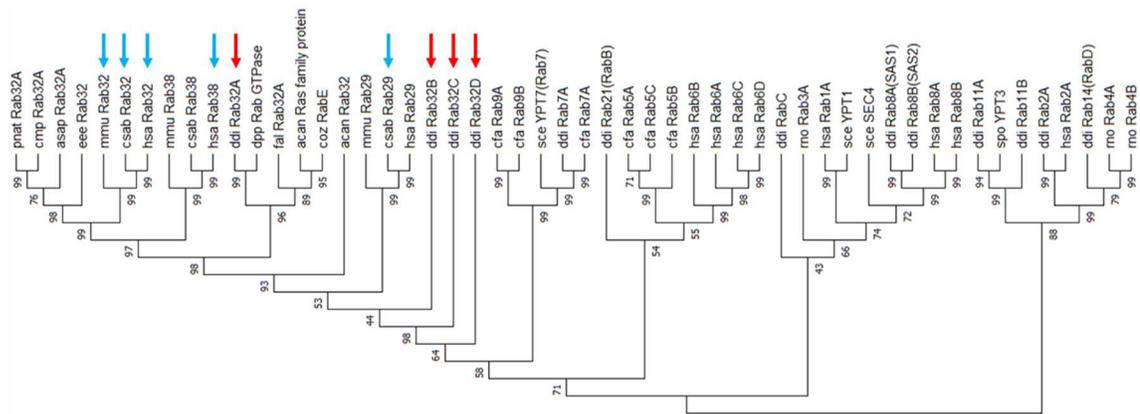


Figura 8. Análisis filogenético de las proteínas Rab32 codificadas en el genoma de la ameba *D. discoideum*. Cladograma que representa la distribución y relación filogenética de las proteínas Rab32 de *D. discoideum* (ddi) con proteínas Rab de otro organismos eucariontes [hsa: *Homo sapiens* (Humano), Csab: *Chlorocebus sabaues* (Mono Verde Africano), mmu: *Mus musculus* (Ratón), mno: *Rattus norvegicus* (Rata), cfa: *Canis lupus familiaris* (Perro), dpp: *Dictyostelium purpureum* (Ameba), acan: *Acanthamoeba castellanii* (Ameba), coz: *Capsaspora owczarzaki* (Protista ameboide), fal: *Fonticula alba* (Protista ameboide), sce: *Saccharomyces cerevisiae* (Levadura), spo: *Schizosaccharomyces pombe* (Levadura), eee: *Electrophorus electricus* (Anguila Eléctrica), cmp: *Colossoma macropomum* (Pez/Cachama Negra), pnat: *Pygocentrus nattereri* (Piraña de vientre rojo), asap: *Alosa sapidissima* (Pez/Sábalo Americano)]. Se indica la posición relativa de las proteínas Rab32 de *D. discoideum* (**flechas rojas**) y de las proteínas Rab de origen mamífero en que se ha confirmado experimentalmente la proteólisis por parte del efector GtgE (**flechas azules**). El análisis se realizó mediante el método de Máxima Probabilidad/Verosimilitud (*Maximum Likelihood*) en el software MEGA 11 con un *Bootstrapping* de 4.000 repeticiones. El número en cada ramificación corresponde al porcentaje de veces en que cada clado se organizó de una misma forma respecto al total de repeticiones.

11.2.- Los efectores GtgE y SopD2 contribuyen a la supervivencia intracelular y virulencias de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*

En macrófagos murinos, mutantes nulas de los genes *gtgE* y *sopD2* de *S. Typhimurium* tienen defectos en su supervivencia intracelular. Estas mutantes también resultan atenuadas *in vivo*, teniendo una baja virulencia y colonización sistémica en ratones (Spanò & Galán, 2012; Spanò *et al.*, 2016). Para determinar si GtgE y SopD2 también contribuyen a la supervivencia de *S. Typhimurium* al interior de *D. discoideum*, se generaron las mutantes por delección Δ *gtgE*, Δ *sopD2* y Δ *gtgE* Δ *sopD2* en *S. Typhimurium* 14028s como fondo genético silvestre, usando el método de intercambio

alélico dependiente del sistema de recombinación Red del fago Lambda, con modificaciones (Santiviago *et al.*, 2009) (ver **Sección 10.9**).

La supervivencia intracelular de estas mutantes en *D. discoideum* se evaluó a través de ensayos de infección en competencia con la cepa silvestre (ver **Sección 10.12**). En estos ensayos, se observó un incremento de ~1,5 veces en la internalización de las mutantes $\Delta gtgE$, $\Delta sopD2$ y $\Delta gtgE \Delta sopD2$ en comparación a *S. Typhimurium* silvestre (**Fig. 9A**). Este comportamiento también se evidenció para la mutante $\Delta aroA$ (**Fig. 9A**), la cual tiene una delección de un gen no asociado al proceso de invasión y que con anterioridad ya había registrado una internalización exacerbada en nuestro laboratorio (Urrutia *et al.*, 2018). Cuando a las mutantes $\Delta gtgE$ y $\Delta sopD2$ se les reincorporó su respectivo gen nativo mediante complementación en *trans* con un vector de expresión (ver **Sección 10.12**), su internalización relativa se redujo a niveles comparables a los de la cepa silvestre, siendo también significativamente menor a los valores de las mutantes transformadas con el vector vacío que mantuvieron una internalización elevada (**Fig. 10A**). Por otro lado, la supervivencia intracelular de todas las mutantes en *D. discoideum* fue significativamente menor a los niveles de la cepa silvestre en los diferentes tiempos de infección (**Fig. 9B**). Este fenotipo fue similar al comportamiento de la mutante metabólica $\Delta aroA$, la cual se incluyó como control porque sus defectos para sobrevivir dentro de la ameba ya han sido reportados por nuestro grupo (Riquelme *et al.*, 2016). Contrariamente, en las mutantes $\Delta gtgE$ y $\Delta sopD2$ complementadas en *trans*, se observó una supervivencia similar a la de la cepa silvestre a lo largo de la infección de *D. discoideum* (**Fig. 10B**). La supervivencia de ambas mutantes complementadas fue también estadísticamente mayor que la de sus contrapartes transformadas con el vector vacío, cuya deficiencia para sobrevivir intracelularmente se mantuvo (**Fig. 10B**).

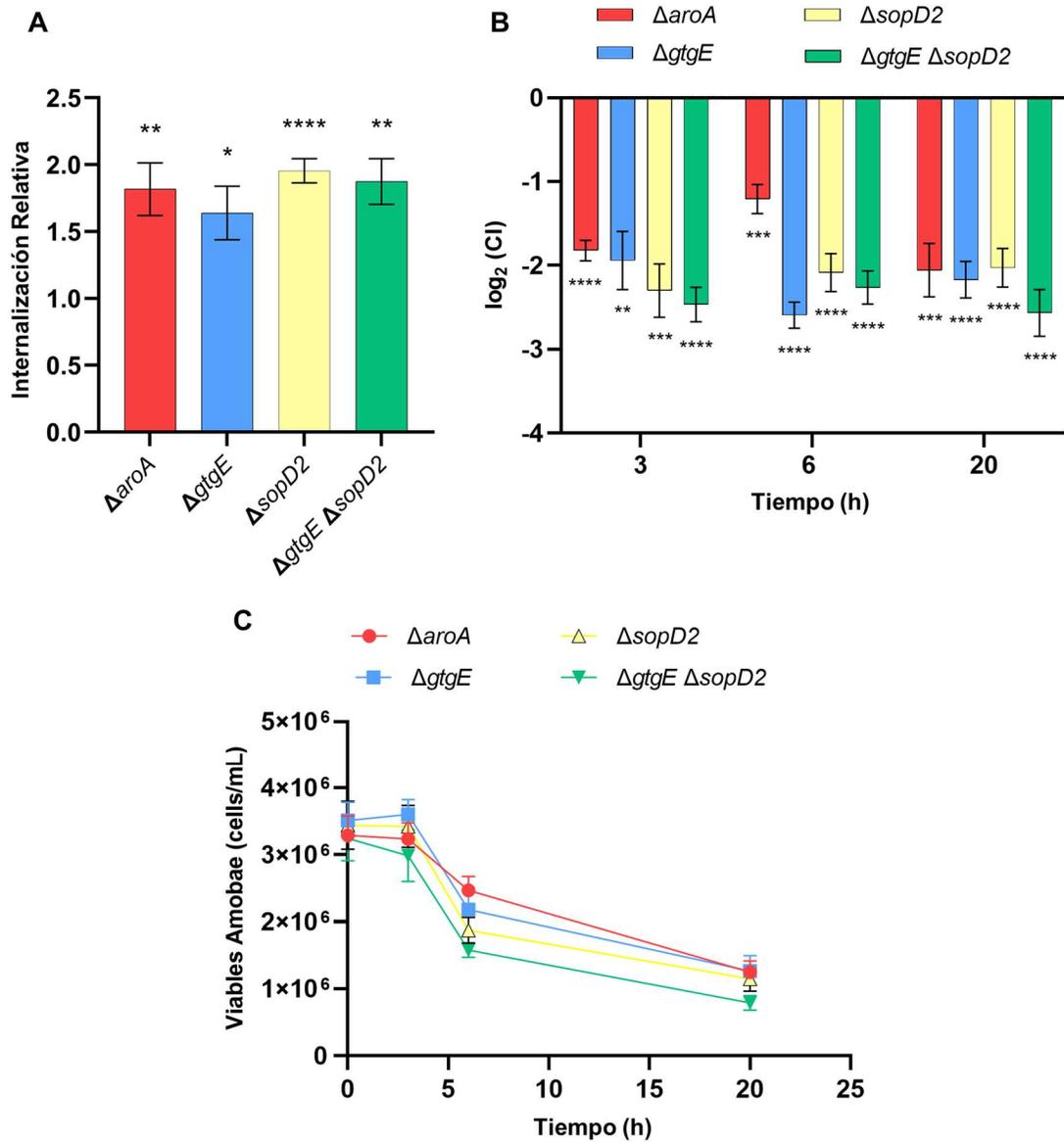


Figura 9. Internalización y supervivencia intracelular de las mutantes $\Delta gtgE$, $\Delta sopD2$ y $\Delta gtgE \Delta sopD2$ de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*. La capacidad de las mutantes $\Delta gtgE$ (azul), $\Delta sopD2$ (amarillo) y $\Delta gtgE \Delta sopD2$ (verde) de *S. Typhimurium* para sobrevivir intracelularmente en *D. discoideum*, se determinó a través de ensayos de infección en competencia. **(A)** La internalización relativa se calculó como la razón entre las UFC de cada mutante (mut) y las UFC de la cepa silvestre (WT) después del tiempo de co-incubación de las amebas con las bacterias ($t=0$), dividido por la razón entre las UFC de las mutantes y las UFC de la cepa silvestre en el inóculo (i) ($[UFC_{mut}/UFC_{WT}]_{t=0}/[UFC_{mut}/UFC_{WT}]_i$). **(B)** El índice de competencia (IC) de cada mutante es expresado como \log_2 para los tiempos 3, 6 y 20 h post infección. Este índice se calculó como la razón entre las UFC de cada mutante y las UFC de la cepa silvestre a cada tiempo de infección ($t=x$), dividido por la misma razón al tiempo $t=0$ ($[UFC_{mut}/UFC_{WT}]_{t=x}/[UFC_{mut}/UFC_{WT}]_{t=0}$). **(C)** La población de amebas viables a cada tiempo se determinó por recuento en cámara de Neubauer con tinción de azul de tripán y está expresada como células/mL. Cada barra representa el promedio de 4 ensayos independientes \pm SEM. La significancia estadística de la diferencia entre la internalización relativa e IC de cada mutante y un valor teórico de referencia (que indica una condición en que no existe diferencia respecto al comportamiento de la cepa silvestre), se determinó usando la prueba *One-Sample t-Test* (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$).

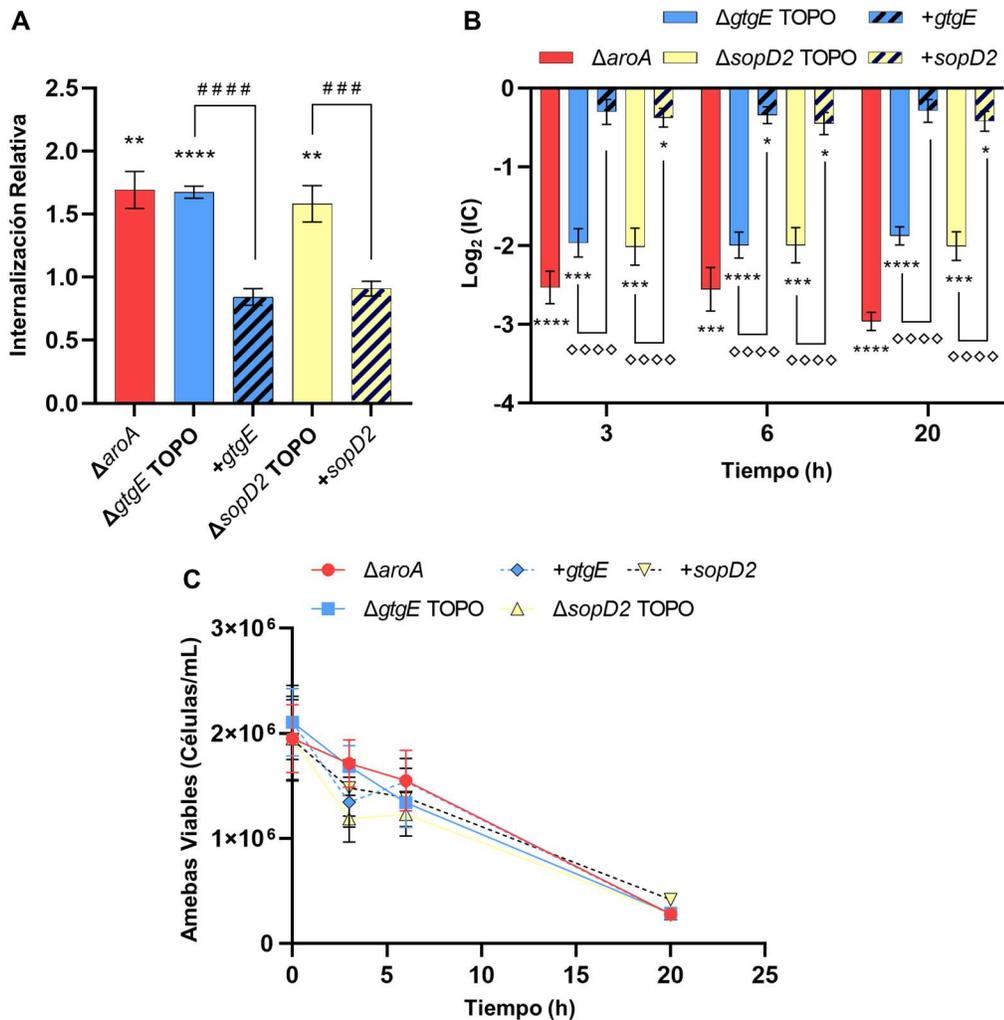


Figura 10. Internalización y supervivencia intracelular de las mutantes $\Delta gtgE$ y $\Delta sopD2$ de *S. Typhimurium* complementadas *in trans* durante la infección de *D. discoideum*. La capacidad para sobrevivir intracelularmente de las mutantes $\Delta gtgE$ (+ $gtgE$), $\Delta sopD2$ (+ $sopD2$) de *S. Typhimurium* complementadas *in trans* (+ $gtgE$ y + $sopD2$), así como de sus contrapartes transformadas con el correspondiente vector vacío ($\Delta gtgE$ TOPO y $\Delta sopD2$ TOPO), se determinó a través de ensayos de infección en competencia realizados en la ameba *D. discoideum*. (A) La internalización relativa se calculó como la razón entre las UFC de cada mutante (mut) y las UFC de la cepa silvestre (WT) después del tiempo de co-incubación de las amebas con las bacterias (t=0), dividido por la razón entre las UFC de las mutantes y las UFC de la cepa silvestre en el inóculo (i) ($[UFC_{mut}/UFC_{WT}]_{t=0}/[UFC_{mut}/UFC_{WT}]_i$). (B) El índice de competencia (IC) de cada mutante es expresado como \log_2 para los tiempos 3, 6 y 20 h post infección. Este índice se calculó como la razón entre las UFC de cada mutante y las UFC de la cepa silvestre a cada tiempo de infección (t=x), dividido por la misma razón al tiempo t=0 ($[UFC_{mut}/UFC_{WT}]_{t=x}/[UFC_{mut}/UFC_{WT}]_{t=0}$). (C) La población de amebas viables a cada tiempo se determinó por recuento en cámara de Neubauer con tinción de azul de tripán y está expresada como células/mL. Cada barra representa el promedio de 3 ensayos independientes \pm SEM. La significancia estadística de la diferencia entre la internalización relativa e IC de cada mutante y un valor teórico de referencia (que indica una condición en que no existe diferencia respecto al comportamiento de la cepa silvestre), se determinó usando la prueba *One-Sample t-Test* (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). En la comparación de cada mutante complementada respecto a su contraparte transformada con el vector vacío, la validación estadística de las diferencias se determinó mediante un análisis ANOVA de una cola para la internalización relativa y de dos colas para la supervivencia intracelular, seguido en ambos casos de la prueba de comparación múltiple de Tukey (**** $P < 0,0001$).

La viabilidad celular de las amebas disminuyó en el transcurso de todas las infecciones, especialmente en los tiempos 6 h y 20 h (**Fig. 9C** y **Fig. 10C**). Esta es una tendencia normalmente observada en los ensayos de infección de *D. discoideum* con *S. Typhimurium* y no distorsiona los valores de supervivencia intracelular, porque al ser ensayos de infección en competencia, las UFC de cada mutante se recuperan junto a las UFC de la cepa silvestre desde las amebas infectadas.

Adicionalmente, se evaluó la contribución de los efectores GtgE y SopD2 a la virulencia de *S. Typhimurium* en *D. discoideum* en virtud de la capacidad de las distintas cepas bacterianas para retrasar el ciclo de desarrollo social de la ameba (Urrutia *et al.*, 2018; Varas *et al.*, 2018). Para esto, se inoculó a *D. discoideum* sobre un césped de las diferentes mutantes de *S. Typhimurium* y se monitoreó en el tiempo la aparición de placas de fagocitosis y estructuras del ciclo social de la ameba (ver **Sección 10.14**). En el caso de la cepa silvestre, se observan placas de fagocitosis claramente definidas en el día 4 y el inicio del desarrollo social se retrasó hasta el día 7, donde se comenzó a observar la aparición de estructuras sociales de la ameba. A diferencia de esto, para las mutantes $\Delta gtgE$, $\Delta sopD2$ y $\Delta gtgE \Delta sopD2$ se observaron focos incipientes de fagocitosis a contar del día 3 y ya desde el día 5 se identificó la formación inicial de estructuras elevadas propias del ciclo social (**Fig. 11A**). Este comportamiento fue más cercano al observado para la mutante $\Delta aroA$, cepa que se incluyó como control de virulencia atenuada y donde las estructuras elevadas de la ameba se observaron desde el día 4. Para *Klebsiella pneumoniae*, incorporada como control de viabilidad de las amebas, el desarrollo social se inició rápidamente a partir del día 2 (**Fig. 11A**), siendo consistente con que esta bacteria no es patogénica para *D. discoideum* y que normalmente se utiliza como su alimento en cultivo (ver **Sección 10.6**).

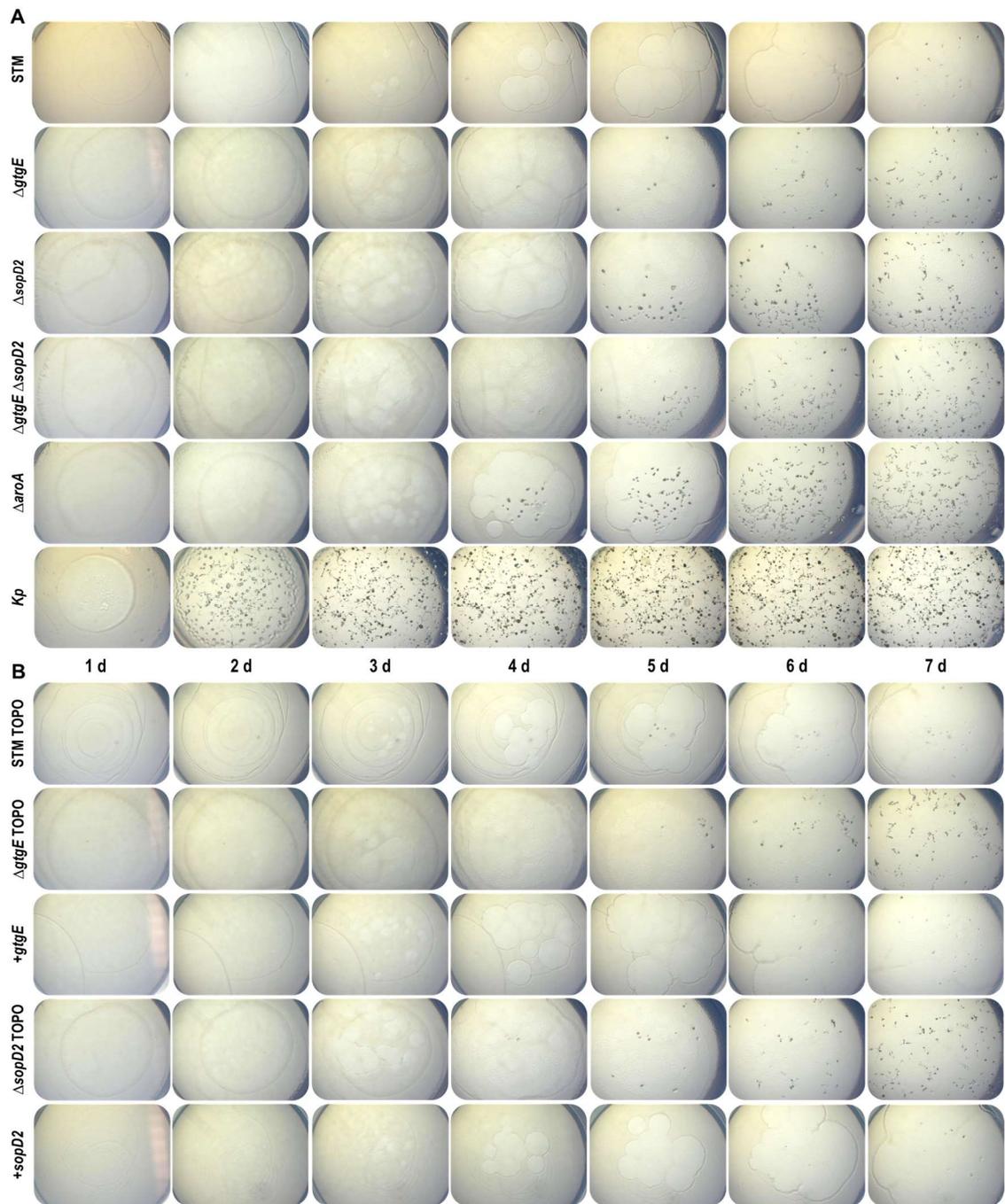


Figura 11. Evaluación del retardo en el ciclo de desarrollo social de *D. discoideum* causado por distintas cepas de *S. Typhimurium*. La progresión del ciclo de desarrollo social de *D. discoideum* se evaluó en medio sólido inoculando 10^4 amebas totales sobre un césped bacteriano en agar N de la (A) cepa silvestre (STM) y las distintas mutantes ($\Delta gtgE$, $\Delta sopD2$ y $\Delta gtgE \Delta sopD2$) de *S. Typhimurium*, así como también de las (B) mutantes complementadas en *trans* ($+gtgE$ y $+sopD2$) y sus contrapartes transformadas con el vector vacío (STM TOPO, $\Delta gtgE$ TOPO y $\Delta sopD2$ TOPO). La aparición de placas de fagocitosis y de las diferentes estructuras del ciclo social de la ameba se monitoreó diariamente durante 7 días (d). La mutante $\Delta aroA$ se utilizó como un control de virulencia atenuada en la ameba. *K. pneumoniae* (*Kp*) se incluyó como un control de viabilidad de *D. discoideum*, ya que es la especie bacteriana que se utiliza como alimento en su propagación rutinaria.

Por otra parte, las mutantes $\Delta gtgE$ y $\Delta sopD2$ complementadas retrasaron el desarrollo social de la ameba en una forma similar a como ocurre con *S. Typhimurium* silvestre, comenzando la formación de estructuras elevadas en el día 7 (**Fig. 11B**). En cambio, en el caso de las mutantes transformadas con el vector vacío las estructuras se visualizaron desde el día 5 (**Fig. 11B**). El estado de avance del ciclo social de *D. discoideum* en cada condición, se analizó y valorizó de acuerdo a una escala de puntuación (ver **Sección 10.14**) para obtener una cinética semicuantitativa del desarrollo de la ameba frente a las diferentes cepas bacterianas. Este análisis mostró que las mutantes $\Delta gtgE$, $\Delta sopD2$ y $\Delta gtgE \Delta sopD2$, al igual que la mutante atenuada $\Delta aroA$, permiten una progresión del ciclo de la ameba más rápida que la cepa silvestre, la cual es capaz de retardarlo eficientemente. Esta diferencia entre las mutantes y la cepa silvestre se torna significativa a contar del día 5 (**Fig. 12A**). Cuando las mutantes $\Delta gtgE$ y $\Delta sopD2$ fueron complementadas en *trans* con sus correspondientes genes nativos, se restauró su capacidad para retardar el desarrollo social de *D. discoideum*, mostrando ambas un comportamiento similar a la cepa silvestre. Al mismo tiempo, existe una marcada diferencia entre las mutantes complementadas y sus contrapartes transformadas con el vector vacío, la cual resultó estadísticamente significativa en los días 6 y 7 (**Fig. 12B**).

En conjunto, los resultados de los ensayos de infección y de retardo del desarrollo del ciclo social de la ameba, sugieren que los efectores GtgE y SopD2 contribuyen en la supervivencia intracelular y virulencia de *S. Typhimurium* durante la infección de *D. discoideum*.

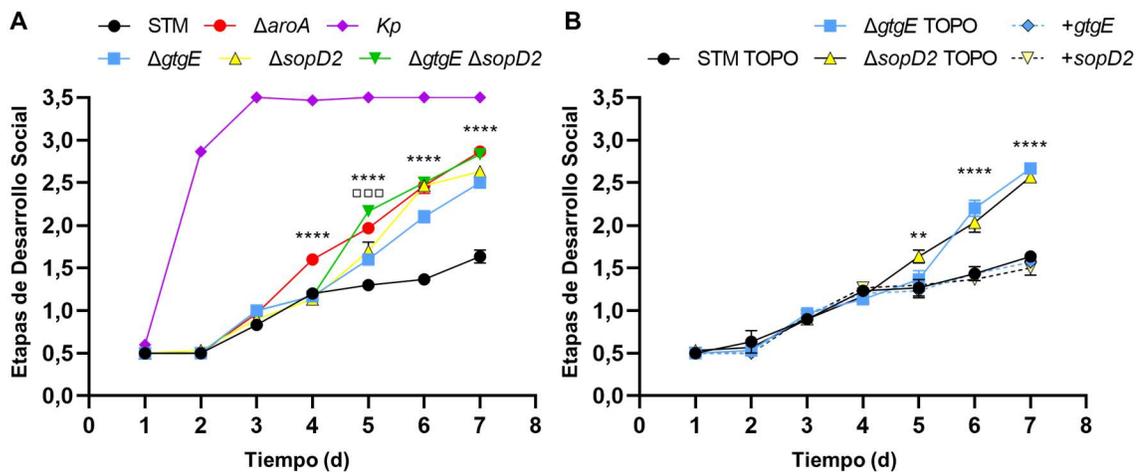


Figura 12. Cinética de retardo del desarrollo social de *D. discoideum* frente a distintas cepas de *S. Typhimurium*. Se evaluó de manera semicuantitativa el grado de retardo en el desarrollo social de *D. discoideum* generado por la (A) cepa silvestre (STM) y las distintas mutantes (Δ gtgE, Δ sopD2 y Δ gtgE Δ sopD2) de *S. Typhimurium*, así como también por las (B) mutantes complementadas en *trans* (+gtgE y +sopD2) y sus contrapartes transformadas con el vector vacío (STM TOPO, Δ gtgE TOPO y Δ sopD2 TOPO). Para esto, se utilizó una escala de puntuación basada en la etapa de desarrollo alcanzada por la ameba cada día (d) (ver **Sección 10.14**). El gráfico muestra el promedio de 3 ensayos independientes \pm SEM. La validación estadística de las diferencias se determinó mediante un análisis ANOVA de dos colas seguida de la prueba de comparación múltiple de Tukey. En la comparación de las mutantes sin complementar respecto a la cepa silvestre (A), todas las mutantes mostraron una significancia de **** $P < 0,0001$, a excepción de la mutante Δ gtgE en el día 5 ($\square\square\square P < 0,001$). En el día 4 sólo la mutante Δ aroA resultó significativamente diferente a *S. Typhimurium* silvestre. Por su parte, al comparar las mutantes transformadas con el vector vacío (Δ gtgE TOPO y Δ sopD2 TOPO) con sus respectivas contrapartes complementadas en *trans* (B), se observaron diferencias con una significancia de **** $P < 0,0001$ para ambos casos en los días 6 y 7. Esta diferencia también se evidenció en el día 5, pero sólo para la mutante Δ sopD2 TOPO (** $P < 0,01$).

11.3.- Distribución subcelular de la proteína Rab32A en *D. discoideum* infectado con *S. Typhimurium*

En macrófagos murinos y otras líneas celulares de mamífero, los efectores GtgE y SopD2 interfieren con el reclutamiento de la proteína Rab32 hacia la SCV durante una infección por *S. Typhimurium*, favoreciendo la supervivencia intracelular de la bacteria (Spanò & Galán, 2012; Spanò *et al.*, 2016). En *D. discoideum*, la proteína Rab32A ha sido identificada en fagosomas de la ameba (Gotthardt *et al.*, 2006) y asociada a la LCV (Hoffmann *et al.*, 2014; Schmölders *et al.*, 2017) usando aproximaciones proteómicas. Para evaluar la localización subcelular de Rab32A, determinar si es reclutada hacia la

SCV en *D. discoideum*, y si GtgE y SopD2 alteran dicho reclutamiento, se generó un linaje de la ameba que expresa ectópicamente esta proteína, como una fusión al reportero fluorescente GFP desde un plasmidio recombinante (ver **Sección 10.15**). Para esto, el marco de lectura de Rab32A se amplificó por PCR desde una librería de cDNA de *D. discoideum* y se clonó mediante digestión con enzimas de restricción en el plasmidio pDM1045 que codifica la proteína GFP. Rab32A se insertó inmediatamente río arriba del marco de lectura de GFP en este plasmidio, generando una proteína de fusión C-terminal al reportero fluorescente. El plasmidio recombinante pDM1045::*rab32A* se utilizó para transformar a *D. discoideum* por electroporación.

En las amebas transformantes, la expresión fenotípica de la proteína de fusión Rab32A-GFP se confirmó mediante microscopía de epifluorescencia como la emisión de fluorescencia verde, señal que no se detectó en *D. discoideum* transformado con el plasmidio pDM1045 vacío como control (resultados no mostrados). Posteriormente, las amebas que expresan Rab32A-GFP se analizaron mediante microscopía confocal y se observó que la proteína se distribuye abarcando gran parte del citoplasma celular, pero manteniendo un patrón punteado discreto. También se observó algunos espacios circulares de tamaño variable sin marca, que podrían corresponder a algún tipo de vesícula o compartimiento membranosos (**Fig. 13A**).

En ensayos de infección de *D. discoideum* con las distintas cepas de *S. Typhimurium*, el patrón de distribución de Rab32A-GFP no cambió respecto al observado en amebas sin infectar. Además, no se observó una diferencia robusta en la localización subcelular de Rab32A-GFP al comparar amebas infectadas con la cepa silvestre o con la doble mutante $\Delta gtgE \Delta sopD2$ (**Fig. 13B**), donde la proteína no se concentró alrededor de la bacteria como si se ha descrito para modelos celulares de mamífero (Spanò *et al.*, 2016). Algo similar se observó también en la infección con

Escherichia coli B/r, empleada como control por ser degradada por *D. discoideum* tras su fagocitosis (Riquelme *et al.*, 2016).

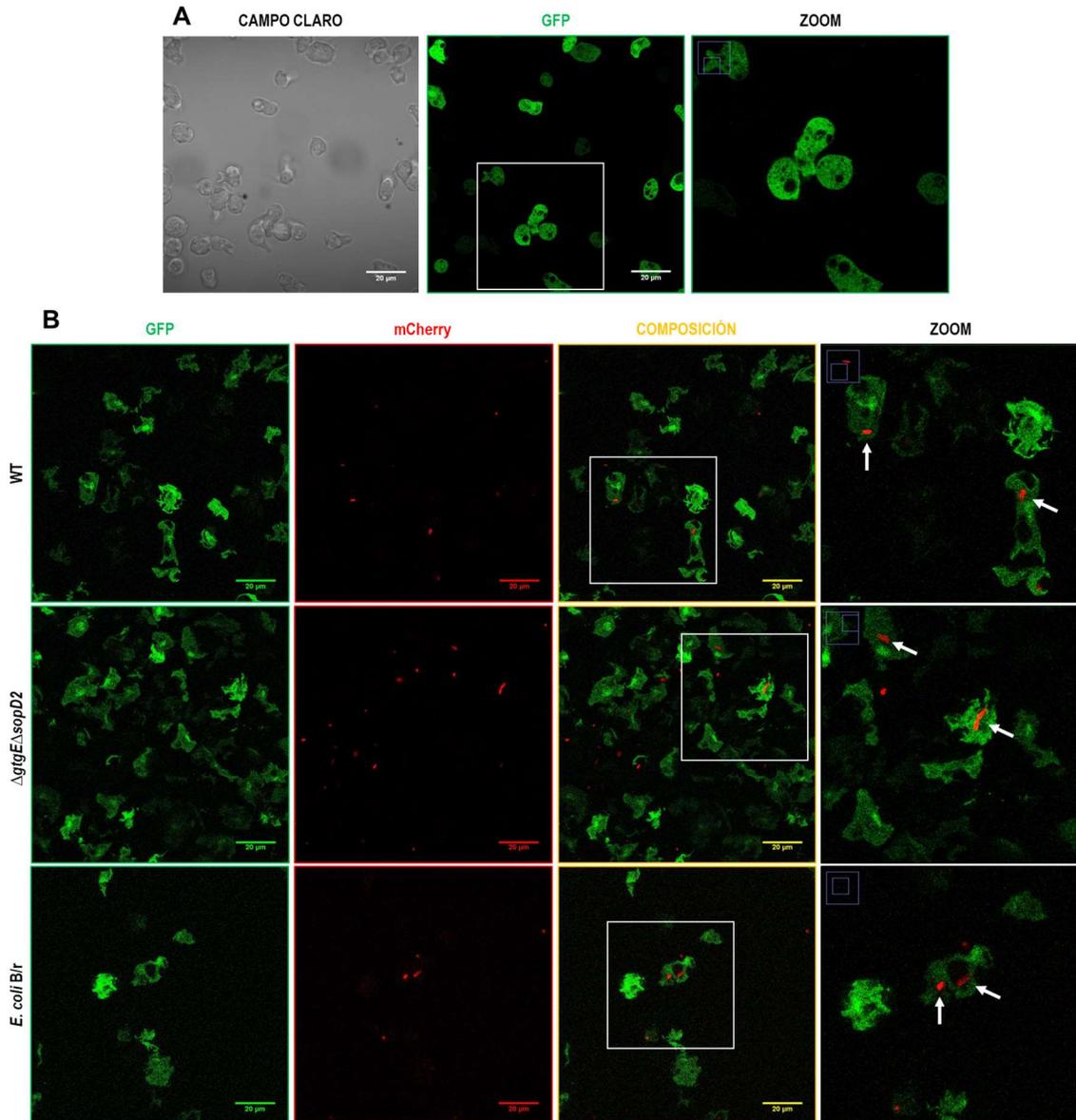


Figura 13. Evaluación de la distribución subcelular de la proteína de fusión Rab32A-GFP en *D. discoideum* mediante microscopía confocal. Detección de la proteína de fusión Rab32A-GFP (verde) en *D. discoideum* transformado con el plasmidio recombinante pDM1045::rab32A en ausencia de infección (A) o infectado durante 1 h (B) con la cepa silvestre (STM 14028s) de *S. Typhimurium*, su contraparte doble mutante Δ gtgE Δ sopD2 o *E. coli* B/r como control. Todas las cepas bacterianas (rojo) se transformaron con el plasmidio pFCcGi para expresar la proteína fluorescente mCherry. En todos los casos se incluye una magnificación 2x (ZOOM) de una zona acotada del campo visual (recuadro blanco), donde se destacan (flechas blancas) regiones del citoplasma celular desprovistas de marca verde (A) o la presencia de bacterias intracelulares (B). Las imágenes fueron adquiridas usando un microscopio confocal de escaneo láser Zeiss LSM 700 equipado con un objetivo 100x en aumento 0,5x. Barra de escala, 20 μ m.

Normalmente, las proteínas Rab permanecen solubles en el citoplasma, pero al adoptar su conformación activa exponen un grupo lipídico que les permite asociarse a las distintas membranas celulares (Alexandrov *et al.*, 2011). Este lípido se incorpora como una modificación post-traducciona l mediante una reacción de lipidación (prenilación) en el extremo C-terminal de las proteínas Rab (Alexandrov *et al.*, 2011). De esta forma, la presencia del reportero GFP en el extremo C-terminal de la fusión Rab32A-GFP podría estar interfiriendo con la lipidación de la GTPasa y provocar que la distribución citoplasmática observada (**Fig. 13A**) sea un artefacto. Adicionalmente, esta distribución también podría ser efecto de una concentración excesiva de la proteína debido a su expresión constitutiva desde el plasmidio pDM1045::*rab32A*. Con el propósito de resolver ambas situaciones, se generó una nueva proteína de fusión acoplando el reportero GFP al extremo N-terminal de Rab32A (GFP-Rab32A) en una construcción cuya expresión depende de un promotor inducible por doxiciclina. La proteína GFP-Rab32A se monitoreó mediante microscopía confocal en amebas transformadas con el plasmidio recombinante pDM334::*rab32A*, tanto sin infectar como infectadas con la cepa silvestre y la doble mutante Δ *gtgE* Δ *sopD2* de *S. Typhimurium*. En amebas sin infectar, la fusión GFP-Rab32A se concentró en compartimientos membranosos intracelulares de tamaño variable (**Fig. 14A**). Este patrón de distribución no cambió en respuesta a la infección con *S. Typhimurium*. Además, no se observó una diferencia notoria en la localización subcelular de GFP-Rab32A al comparar amebas infectadas con la cepa silvestre o con la doble mutante Δ *gtgE* Δ *sopD2* de *S. Typhimurium* (**Fig. 14B**).

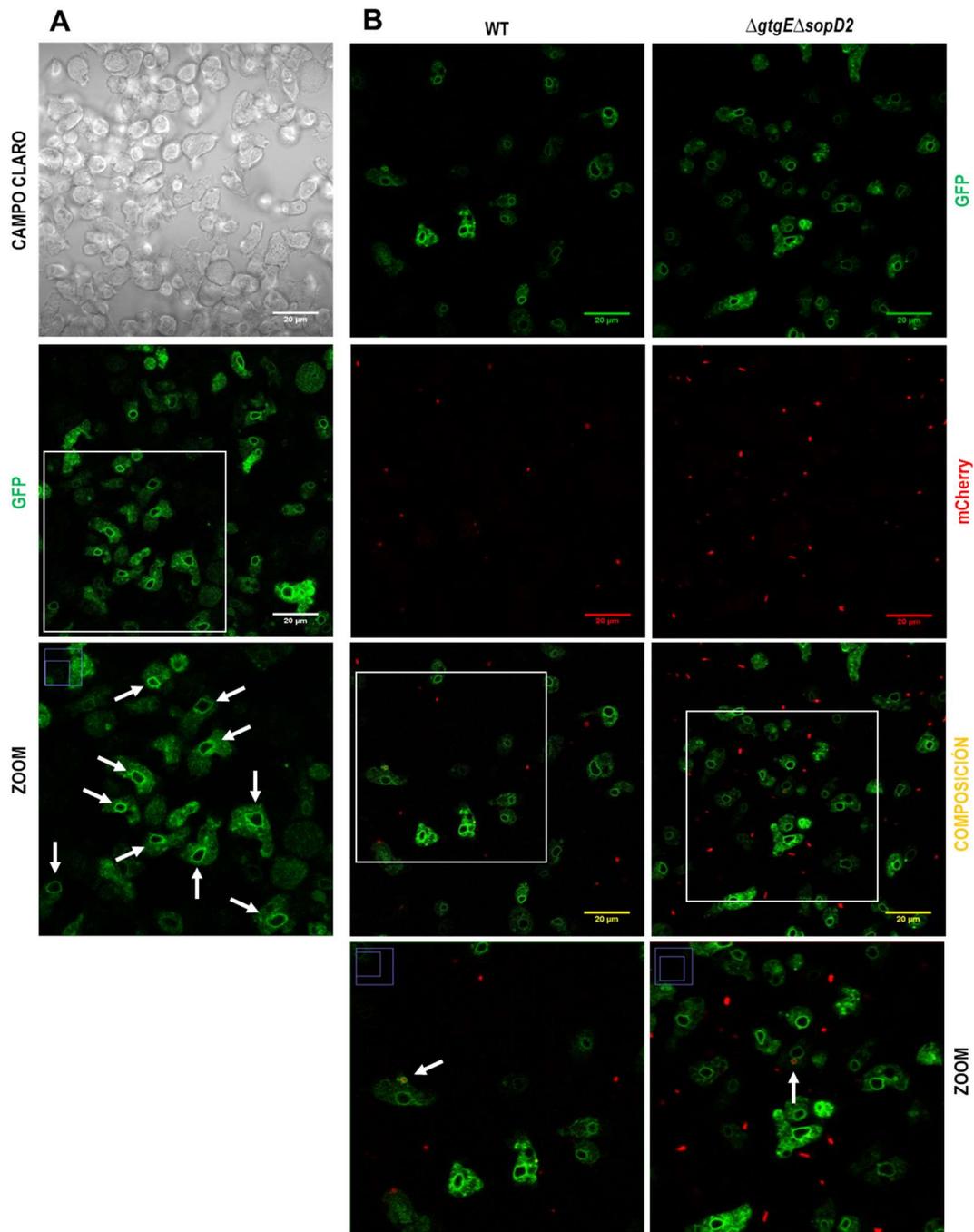


Figura 14. Evaluación de la distribución subcelular de la proteína de fusión GFP-Rab32A en *D. discoideum* mediante microscopía confocal. Detección de la proteína de fusión GFP-Rab32A (verde) en *D. discoideum* transformado con el plasmidio recombinante en ausencia de infección (A) o infectado durante 1 h (B) con la cepa silvestre (WT) de *S. Typhimurium* o su contraparte doble mutante $\Delta gtgE \Delta sopD2$. Las cepas bacterianas (rojo) se transformaron con el plasmidio pFCcGi para expresar la proteína fluorescente mCherry. En todos los casos se incluye una magnificación 2x (ZOOM) de una zona acotada del campo visual (recuadro blanco), donde se destacan (flechas blancas) los compartimientos membranosos en que se acumula la marca verde (A) o la presencia de bacterias intracelulares (B). Las imágenes fueron adquiridas usando un microscopio confocal de escaneo láser Zeiss LSM 700 equipado con un objetivo 100x en aumento 0,5x. Barra de escala, 20 μm .

Las observaciones recopiladas mediante microscopia confocal indican que la proteína Rab32A se asocia a compartimientos membranosos intracelulares en *D. discoideum*. Sin embargo, debido al número limitado de observaciones realizadas no es posible establecer concluyentemente la participación de los efectores GtgE y SopD2 de *S. Typhimurium* en la distribución subcelular de Rab32A en la ameba bajo las condiciones experimentales analizadas.

11.4.- El efector GtgE de *S. Typhimurium* tiene actividad proteolítica contra la proteína Rab32A de *D. discoideum*

Las proteínas humanas Rab32, Rab38 y Rab29, estrechamente relacionadas a nivel filogenético, son blanco de la actividad cisteína proteasa del efector GtgE de *S. Typhimurium* (Spanò & Galán, 20125). Estas proteínas Rab, así como Rab32 de ratón y de mono verde africano, comparten el motivo de secuencia T-I/V-G-V-A-D-F, que es reconocido por GtgE para catalizar el corte proteolítico de las GTPasas (Spanò & Galán, 2015). Este motivo está presente en las 4 proteínas Rab32 de *D. discoideum* (**Fig. 7A**); sin embargo, únicamente Rab32A ha sido identificada en fagosomas de la ameba (Gotthardt *et al.*, 2006) y en la LCV durante la infección por *Legionella* (Hoffmann *et al.*, 2014; Schmolders *et al.*, 2017). Para determinar si Rab32A también es susceptible a la proteólisis por parte de GtgE, la GTPasa se expresó como una fusión C-terminal al epítipo 6xHis (Rab32A-6xHis) en una cepa recombinante de *E. coli* que también expresa heterológamente al efector GtgE silvestre o una versión mutante sin actividad catalítica (GtgE^{H151A}) (ver **Sección 10.16**).

Aunque expresar a Rab32A en *E. coli* como una fusión N- (GFP-Rab32A) o C-terminal (Rab32A-GFP) a GFP permitiría una vinculación más directa de la proteólisis

de la GTPasa por parte de GtgE con las observaciones obtenidas sobre su distribución subcelular en *D. discoideum* (ver **Sección 11.3**), se presentaron dificultades técnicas que imposibilitaron la estandarización de la inmunodetección de GFP con anticuerpos comerciales (resultados no mostrados). Además, así como ocurre para las proteínas Rab32 de mamífero, el motivo de secuencia reconocido por GtgE para el corte proteolítico (Spanò & Galán, 2015) se encuentra en el extremo N-terminal de Rab32A (**Fig. 7A**). Por lo tanto, el corte catalizado por GtgE sobre una fusión GFP-Rab32A podría ser obstaculizado a causa del reportero GFP acoplado al extremo N-terminal de la proteína sustrato. Por estos motivos, se optó por generar una construcción de Rab32A fusionada en su extremo C-terminal a un nuevo epítipo más pequeño que GFP, como 6xHis. Para esto, el marco de lectura de Rab32A se clonó en el vector comercial pBAD-TOPO, incorporando mediante PCR la secuencia codificante del epítipo 6xHis en su extremo 3' (C-terminal en la proteína). Paralelamente, el marco de lectura del alelo silvestre del gen *gtgE* se amplificó mediante PCR desde DNA genómico de *S. Typhimurium* 14028s y se clonó en el vector pSEVA254 (Jahn *et al.*, 2016) bajo el control de un promotor inducible por IPTG. El mismo procedimiento de clonamiento se efectuó con un alelo mutante de *gtgE*, cuyo marco de lectura se sintetizó químicamente para incorporar una mutación puntual en su secuencia nucleotídica, la cual produce la sustitución del residuo de histidina 151 por alanina en la correspondiente proteína. Esta sustitución neutraliza la actividad enzimática del efector GtgE (Spanò *et al.*, 2011). Los plasmidios recombinantes se transformaron secuencialmente en la cepa comercial *E. coli* TOP10 y la integridad de Rab32A-6xHis se analizó mediante *Western blot* en lisados bacterianos totales de la cepa co-transformada (**Fig. 15**).

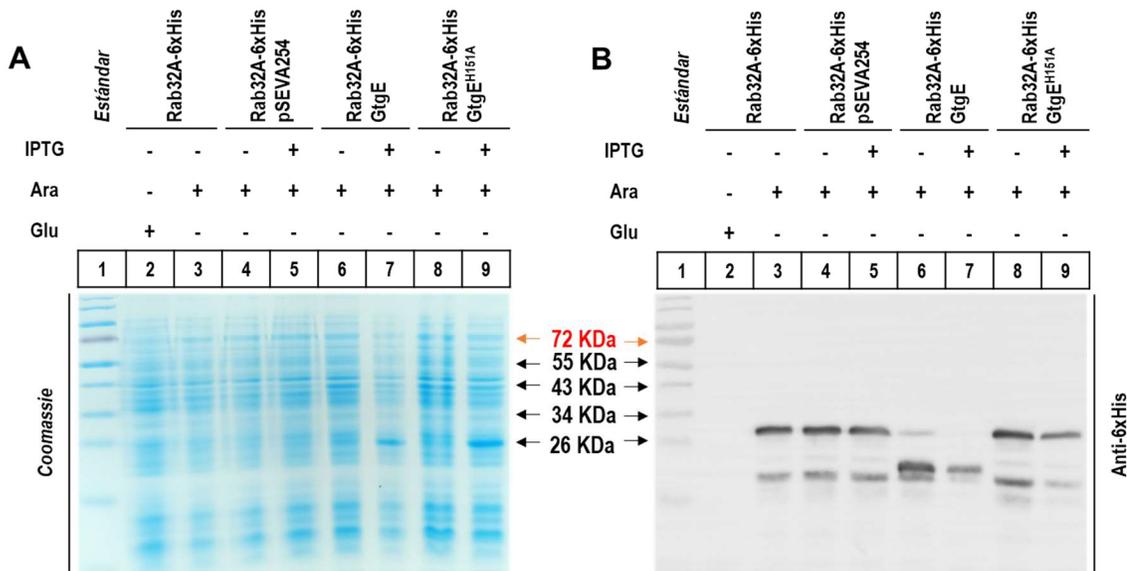


Figura 15. Actividad proteolítica del efector GtgE de *S. Typhimurium* sobre la proteína Rab32A de *D. discoideum*. Lisados bacterianos totales provenientes de cepas recombinantes de *E. coli* que co-expresan la proteína Rab32A de *D. discoideum* como fusión C-terminal al epitopo 6xHis (Rab32A-6xhis) junto al efector GtgE silvestre de *S. Typhimurium* 14028s o una variante mutante sin actividad catalítica (GtgE^{H151A}), se analizaron mediante SDS-PAGE (**A**) e inmunodetección por *Western blot* con un anticuerpo primario comercial anti-6xHis (**B**). La expresión de la proteína Rab32A-6xHis y del efector GtgE silvestre o GtgE^{H151A} se indujo con 10 mM de arabinosa (Ara) y 1 mM de IPTG, respectivamente. Como control, se incluyó una cepa que sólo puede expresar a la proteína Rab32A-6xHis, la cual en un caso fue inducida con Ara (carril 3) y en otro reprimida catabólicamente con 0,2% de glucosa (Glu; carril 2). Además, como un control adicional, se incorporó una cepa que expresa a Rab32A-6xHis y que está transformada con el vector pSEVA254 vacío (carriles 4 y 5), donde se clonó el marco de lectura que codifica al efector silvestre o mutante. La expresión de la proteína Rab32-6xHis ante la inducción con Ara (carril 3B) se observó mediante *Western blot* (B) como la aparición de una banda compatible con su tamaño teórico (25,79 KDa). Esta banda no se apreció en la condición de represión catabólica con Glu (carril 2B). Al inducir GtgE silvestre (carril 7B), pero no su contraparte mutante (carril 9B), la proteólisis de Rab32A-6xHis se observó como una completa desaparición de la banda de mayor tamaño en el *Western blot*. La inducción de GtgE silvestre (carril 7A) y GtgE (carril 9A) en respuesta a IPTG se evidenció mediante SDS-PAGE (A) como una banda que coincide con la estimación *in silico* de su tamaño (26,07 KDa). Como referencia, se incluyó un estándar de tamaño molecular de proteínas (carril 1).

Al inducir la expresión del efector GtgE silvestre, pero no así la de su contraparte mutante GtgE^{H151A}, la banda correspondiente a la inmunodetección de Rab32A-6xHis (~25,79 KDa) desapareció y concomitantemente, se observó la aparición de una banda de menor tamaño (~20,27 KDa) (**Fig. 15B**). Esta banda más pequeña coincide con la estimación *in silico* del producto de proteólisis de Rab32A por parte de GtgE. En la inmunodetección (**Fig. 15B**), aún en ausencia de la inducción de GtgE, se detectan algunas bandas de un tamaño menor al de la proteína Rab32A-6xHis completa. Como

estas bandas están presentes cuando se induce, pero no cuando se reprime la expresión de Rab32A-6xHis, se podría descartar una reactividad inespecífica de los anticuerpos y atribuir las a una proteólisis de la proteína de fusión por parte de otras proteasas presentes en el lisado bacteriano, por observarse en todas las condiciones.

Los resultados obtenidos en este ensayo de proteólisis indican que el efector GtgE de *S. Typhimurium* cataliza un corte proteolítico en la proteína Rab32A de *D. discoideum*, como lo sugiere la presencia del motivo reconocido por el efector bacteriano en la secuencia aminoacídica de la GTPasa (**Fig. 7A**).

12.- DISCUSIÓN

12.1- Participación de los efectores GtgE y SopD2 de *S. Typhimurium* en la interacción con la ameba *D. discoideum* en un contexto de infección

La proteína Rab32 es una GTPasa monomérica que, entre otras funciones, constituye un mecanismo para restringir el crecimiento de bacterias patógenas intracelulares, como *Mycobacterium*, *Listeria* y *Salmonella* en macrófagos murinos y otras líneas celulares de hospederos eucariontes superiores (Seto *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2011, Spanò & Galán, 2013, Li *et al.*, 2016, Solano *et al.*, 2018). Ante esto, los efectores GtgE (cisteína proteasa) y SopD2 (proteína activadora de GTPasas; GAP) de *S. Typhimurium* actúan cooperativamente para contrarrestar el rol antimicrobiano de Rab32 y contribuyen a la patogénesis de la bacteria durante su ciclo infectivo. Tanto GtgE como SopD2 son necesarios para la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* *in vitro* en macrófagos de origen murino (Spanò & galán, 2012; Spanò *et al.*, 2016) y también están implicados en la colonización sistémica de la bacteria en ratones, dónde SopD2 es especialmente preponderante, ya que la mutante $\Delta sopD2$ muestra una mayor atenuación que la mutante $\Delta gtgE$ (Spanò *et al.*, 2016). Asimismo, este fenotipo atenuado es aún más exacerbado en la doble mutante $\Delta gtgE \Delta sopD2$ (Spanò *et al.*, 2016), reflejando la acción cooperativa que ha sido demostrada para ambos efectores *in vitro* (Wachtel *et al.*, 2018).

En *D. discoideum*, ameba modelo utilizada para estudiar la interacción de *Salmonella* y otras bacterias patógenas con protozoos en el ambiente (Steinert, 2011), nuestro grupo ha demostrado que *S. Typhimurium* tiene la capacidad de sobrevivir intracelularmente y que requiere de muchos factores de virulencia que también son

necesarios en células de mamífero, como lo son el T3SS-1 y T3SS-2 (Riquelme *et al.*, 2016), y sus distintos efectores como SopB, SifA, SseF, SseG, SseJ, SopF, SptP, entre otros (Urrutia, 2019; Valenzuela, 2019; Vera, 2020; Morgado, 2021; Ortega, 2021; Zabner, 2022). Para determinar si GtgE y SopD2 también contribuyen a la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*, se generaron las cepas bacterianas mutantes $\Delta gtgE$, $\Delta sopD2$ y $\Delta gtgE \Delta sopD2$ (ver **sección 10.9** y **10.11**), y se sometieron a ensayos de infección en la ameba (ver **Sección 10.13**). En las mutantes individuales $\Delta gtgE$ y $\Delta sopD2$ de *S. Typhimurium* se observaron defectos en la supervivencia intracelular en *D. discoideum* (**Fig. 9B**), los cuales se revirtieron cuando los respectivos genes se reincorporaron en *trans* (**Fig. 10B**), sugiriendo que ambos efectores contribuyen a la supervivencia de la bacteria dentro de la ameba durante una infección. Esto coincide con lo descrito previamente para células de mamífero, donde ambos efectores contribuyen a que la bacteria sobreviva en macrófagos murinos (Spanò & Galán, 2012; Spanò *et al.*, 2016). Sin embargo, la mayor preponderancia del efector SopD2 y el comportamiento cooperativo junto a GtgE que se ha descrito *in vivo* en ratones (Spanò *et al.*, 2016) y caracterizado enzimáticamente *in vitro* (Wachtel *et al.*, 2018), no se observan en *D. discoideum*, pues la disminución de la supervivencia intracelular que presentan las mutantes $\Delta gtgE$, $\Delta sopD2$ y $\Delta gtgE \Delta sopD2$ es comparable entre sí (**Fig. 9B**). Esto no necesariamente indica que los efectores GtgE y SopD2 no actúen conjuntamente para favorecer la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*, sino que podría ser una propiedad no observable en el sistema y condiciones experimentales utilizadas. De hecho, en los ensayos de infección en competencia el fenotipo asociado a la mutagénesis de un gen de interés puede exacerbarse respecto a la infección simple de un hospedero (Freter *et al.*, 1981). Esto podría enmascarar la mayor deficiencia que eventualmente tendría la doble mutante

Δ gtgE Δ sopD2 de *S. Typhimurium* para sobrevivir en la ameba comparado con las mutantes individuales, dificultando constatar la cooperatividad de los efectores durante la infección. Por otra parte, en cuanto a la virulencia de las mutantes Δ gtgE, Δ sopD2 y Δ gtgE Δ sopD2 de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*, todas presentaron una atenuación siendo incapaces de retrasar el ciclo de desarrollo social de la ameba con la misma efectividad que la cepa silvestre (**Fig. 11A** y **Fig. 12A**), capacidad que se restauró cuando las mutantes individuales se complementaron en *trans* (**Fig. 11B** y **Fig. 12B**). Esto concuerda con lo que ocurre en la infección de hospederos murinos (Spanò *et al.*, 2016), aunque nuevamente no se observa la mayor contribución de SopD2 ni la cooperatividad de los efectores, pues todas las mutantes muestran un fenotipo atenuado en un grado similar. La contribución de SopD2 a la supervivencia intracelular y virulencia de *S. Typhimurium* en *D. discoideum*, evidenciada como los defectos y atenuación que sufre la mutante Δ sopD2 (**Fig. 9** y **Fig. 11A**), se podrían atribuir a su acción sobre Rab32A, lo cual no se comprobó experimentalmente en esta tesis. No obstante, otra opción es que SopD2 esté interfiriendo través de su dominio N-terminal con el intercambio de nucleótidos de guanina en un homólogo de Rab7 en *D. discoideum*, función que ya se ha descrito para este efector en mamíferos (D'Costa *et al.*, 2015). Para discriminar entre ambos efectos de SopD2, una estrategia genética sería complementar en *trans* la mutante Δ sopD2 con una variante del efector sin actividad GAP (SopD2^{R315A}) (Spanò *et al.*, 2016) y realizar ensayos de infección en la ameba para verificar si SopD2^{R315A} es suficiente o no para restaurar el fenotipo silvestre de *S. Typhimurium*.

12.2.- Proteínas Rab32 de *D. discoideum* como blancos celulares de la actividad catalítica de los efectores GtgE y SopD2 de *S. Typhimurium*

Dentro de la familia de proteínas Rab, que son GTPasas monoméricas que regulan el tráfico vesicular y que determinan la identidad y destinación de compartimientos membranosos intracelulares (Pfeffer, 2013; Zhen & Stenmark, 2015), la proteína Rab32 conforma una subfamilia definida por una variación en la secuencia del motivo conservado de actividad GTPasa (WDTAGQE), dónde el residuo de treonina (T) es reemplazado por isoleucina (I) (Norian *et al.*, 1999). Los miembros de esta subfamilia corresponden a las proteínas Rab32, Rab38 y Ra29, las cuales están estrechamente relacionadas a nivel filogenético (Klöpffer *et al.*, 2012). La presencia de estas proteínas Rab varía entre los distintos grupos taxonómicos eucariontes a lo largo de la evolución. La proteína Rab32 presente en organismos evolutivamente más recientes, cómo lo son los mamíferos, deriva de la proteína anotada como Rab32A en organismos más ancestrales, como las amebas (Ortiz-Sandoval *et al.*, 2014).

El genoma de la ameba *D. discoideum* consta de 4 *loci* anotados como marcos de lectura que codifican proteínas Rab32 (A–D) (ver **Sección 11.1**). Rab32A (también llamada RabE) se identificó originalmente como una proteína con homología a las proteínas Rab29, Rab32 y Rab 38 humanas y a Rab29 de rata, con las cuales también tiene proximidad filogenética (Norian *et al.*, 1999). Esto se condice con los análisis bioinformáticos realizados en este trabajo, dónde específicamente Rab32A mostró una alta identidad y similitud de secuencia aminoacídica con la proteína Rab32 humana (**Fig. 7B**), así como una mayor cercanía a nivel filogenético con proteínas Rab de mamífero que con sus parálogos en *D. discoideum* (**Fig. 8**). Igualmente, todas las proteínas Rab32 de la ameba comparten una alta similitud de secuencia con homólogos

de mamífero (**Fig. 7A**) que se han reportado como blancos de la actividad proteolítica de GtgE (Spanò & Galán, 2012). Es más, dentro de la secuencia compartida, las 4 proteínas Rab32 de *D. discoideum* contienen el motivo T-I/V-G-V-A-D-F, definido experimentalmente como el sitio de corte para GtgE (**Fig. 7A**) (Spanò & Galán, 2012). Esto sugiere que todas las proteínas Rab32 de la ameba son sustratos susceptibles a la proteólisis por parte del efector GtgE de *S. Typhimurium*. Considerando que Rab32A es el ancestro de Rab32 de mamíferos (Ortiz-Sandoval *et al.*, 2014) y que es la única de las proteínas Rab32 de *D. discoideum* que está descrita como asociada a fagosomas (Gotthardt *et al.*, 2006) y a la LCV (Hoffmann *et al.*, 2014; Schmölders *et al.*, 2017), en este trabajo se propuso evaluar si esta GTPasa es proteolizada por acción de GtgE. Para ello, Rab32A se co-expresó heterológamente como una proteína de fusión al epítipo 6xHis junto con GtgE silvestre o una variante mutante sin actividad catalítica (GtgE^{H151A}) (ver **Sección 10.16**). En este sistema, se observó que efectivamente Rab32A es susceptible a la actividad proteolítica del efector GtgE de *S. Typhimurium* (**Fig. 15**), como ocurre para la proteína Rab32, Rab38 y Rab29 de mamíferos. La proteólisis que GtgE ejerce sobre Rab32A podría explicar la participación que se evidenció para el efector en la supervivencia intracelular y la virulencia de *S. Typhimurium* en la ameba (**Fig. 9B**).

Durante la infección de *S. Typhimurium* en una célula hospedera de origen mamífero, el efector SopD2 actúa como GAP sobre Rab32 para estimular su actividad GTPasa intrínseca y conducir a la hidrólisis de la molécula de GTP unida a la proteína celular. Al hidrolizar GTP, Rab32 adopta una conformación inactiva a la que GtgE se puede unir con alta afinidad y proteolizar eficientemente (Wachtel *et al.*, 2018). Una de las limitaciones del sistema de co-expresión heteróloga utilizado en este estudio, es que dificulta evaluar simultáneamente la participación de SopD2 en la proteólisis de Rab32A por GtgE. Una alternativa para superar esta limitación sería realizar un ensayo de

proteólisis *in vitro* con Rab32A y ambos efectores bacterianos purificados (ver **Sección 13**).

12.3.- Distribución subcelular de la proteína Rab32A en *D. discoideum* y su comportamiento en respuesta a la infección por *S. Typhimurium*

La acción cooperativa de GtgE y SopD2 altera la distribución fisiológica de Rab32 durante una infección con *S. Typhimurium*, interfiriendo con su reclutamiento hacia la SCV en células de mamífero (Spanò & Galán, 2011; Spanò & Galán, 2012; Spanò *et al.*, 2016). Cuando estos modelos celulares son infectados con una doble mutante Δ gtgE Δ sopD2 de *S. Typhimurium*, la proteína Rab32 se concentra tempranamente alrededor de la bacteria (Spanò *et al.*, 2016), como también ocurre en serotipos de *Salmonella* que carecen de estos efectores (Spanò & Galán, 2012). En *D. discoideum*, la localización subcelular de Rab32A sólo se ha caracterizado parcialmente a través de fraccionamiento subcelular acoplado a análisis proteómicos, observándose asociada a fagosomas (Gotthardt *et al.*, 2006) y a la LCV (Hoffmann *et al.*, 2014; Schmölders *et al.*, 2017).

Con el propósito de determinar si Rab32A es reclutada hacia la SCV en *D. discoideum* durante una infección por *S. Typhimurium* y si los efectores GtgE y SopD2 interfieren en este reclutamiento, se generaron linajes de la ameba que expresan la GTPasa acoplada al reportero GFP y se infectaron con mutantes nulas de la bacteria en los genes *gtgE* y *sopD2* (ver **Sección 10.15**). En *D. discoideum* que expresa Rab32A como una fusión C-terminal a GFP, no se observó un cambio significativo en la localización subcelular de la proteína en respuesta a una infección con *S. Typhimurium*, no existiendo una diferencia notoria al comparar la cepa silvestre con la mutante Δ gtgE Δ sopD2 (**Fig. 13B**) ni con la condición sin infectar (**Fig. 13A**). En amebas no infectadas,

Rab32A-GFP se distribuyó subcelularmente abarcando todo el citoplasma, pero con múltiples espacios circulares de tamaño variable sin marca fluorescente atribuible a la proteína, los que podrían ser vesículas, vacuolas contráctiles u otros compartimientos membranosos (**Fig. 13A**). Este patrón muy probablemente no representa la distribución fisiológica de Rab32A silvestre en *D. discoideum* y podría corresponder a un artefacto provocado por el alto nivel de expresión constitutiva de la proteína de fusión desde vector pDM1045 (ver **Sección 10.15.1**) y en mayor medida, por la presencia del reportero GFP en su extremo C-terminal. Para asociarse a las membranas celulares, las proteínas Rab requieren de un grupo lipídico que es incorporado como una modificación post-traduccional en residuos de cisteína en su extremo C-terminal (Alexandrov *et al.*, 2011), proceso con el cual podría estar interfiriendo el reportero GFP en la proteína Rab32A-GFP. Esta explicación coincide con las observaciones obtenidas posteriormente para la fusión N-terminal GFP-Rab32A, donde tras la inducción de su expresión desde el vector pDM334 (ver **Sección 10.15.2**), la proteína se acumuló marcadamente en la membrana de compartimientos intracelulares de *D. discoideum* en ausencia de infección (**Fig. 14A**). Esta distribución de GFP-Rab32A asociada a compartimientos membranosos intracelulares, al igual que el patrón citoplasmático de Rab32-GFP, no parecer ser alterado por los efectores GtgE y SopD2 de *S. Typhimurium* en amebas infectadas bajo las condiciones experimentales analizadas (**Fig. 14B**). Este mismo procedimiento experimental realizado con Rab32A, se podría repetir con las otras proteínas Rab32A de *D. discoideum* para conocer también su distribución subcelular y determinar si existen o no similitudes en sus patrones de localización en la ameba (ver **Sección 13**).

12.4.- Infección de *D. discoideum* por *S. Typhimurium*: participación de la GTPasa Rab32A de la ameba y contribución de los efectores bacterianos GtgE y SopD2

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, la GTPasa monomérica Rab32A de *D. discoideum* se asocia a compartimientos membranosos intracelulares de tamaño variable e identidad indeterminada (**Fig. 16**). Cabe destacar que este es el primer reporte en el que se ha observado directamente la distribución subcelular de Rab32A en *D. discoideum* mediante microscopía confocal. De hecho, la localización de esta GTPasa sólo se había caracterizado de forma indirecta en la ameba mediante aproximaciones proteómicas (Gotthardt *et al.*, 2006; Hoffmann *et al.*, 2014; Schmölders *et al.*, 2017).

La infección por *S. Typhimurium* parece no alterar el patrón de distribución subcelular de Rab32A en *D. discoideum*. Si bien observamos que esta GTPasa es reclutada hacia la SCV, no logramos determinar concluyentemente si los efectores GtgE y SopD2 son capaces de interferir en dicho reclutamiento (**Fig. 16**). A pesar de esto, ambos efectores contribuyen a la supervivencia intracelular y virulencia de *S. Typhimurium* durante su interacción con la ameba. La participación de GtgE en dichos procesos se podría atribuir a su capacidad de proteolizar a la proteína Rab32A, en lo cual no se logró establecer si existe una contribución del efector SopD2 (**Fig. 16**). Adicionalmente, las otras proteínas Rab32 codificadas en el genoma de *D. discoideum* (Rab32B–D) también conservan el motivo de secuencia reconocido por GtgE y podrían ser sustrato de la actividad proteolítica del efector (**Fig. 16**).

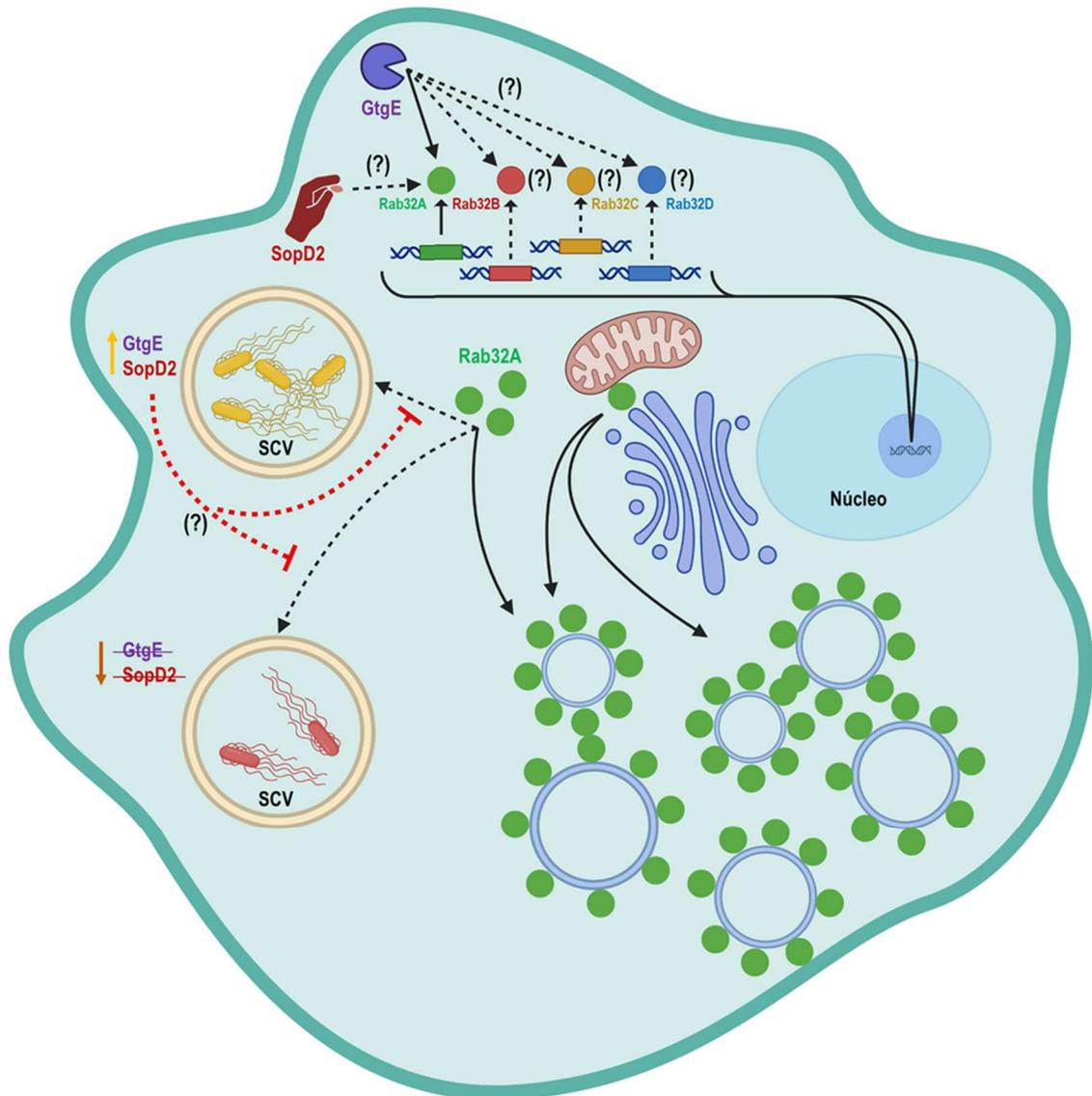


Figura 16. Distribución subcelular de la GTPasa Rab32A en *D. discoideum* y participación de los efectores GtgE y SopD2 de *S. Typhimurium* durante su interacción con la ameba. En *D. discoideum*, la proteína Rab32A se asocia a compartimentos membranosos intracelulares de tamaño variable. Esta distribución subcelular parece no sufrir una alteración en respuesta a la infección de *S. Typhimurium*. Al respecto, cabe destacar que en el presente estudio no fue posible establecer concluyentemente si los efectores GtgE y SopD2 interfieren en el reclutamiento de Rab32A hacia la SCV en la ameba. No obstante, ambos efectores contribuyen a la supervivencia intracelular y virulencia de la bacteria en *D. discoideum*. La contribución de GtgE en ambos procesos se puede explicar directamente por su capacidad de proteólisis a Rab32A, aunque no fue posible determinar si también existe una participación de SopD2 en dicha proteólisis. Por último, nuestros resultados sugieren que las otras proteínas Rab32 codificadas el genoma de la ameba (Rab32B–D) también son blancos potenciales de GtgE al retener el motivo de secuencia reconocido por el efector.

13.- PROYECCIONES & PESPECTIVAS

Como una alternativa experimental para profundizar en la participación de GtgE y SopD2 durante la infección de *D. discoideum* por *S. Typhimurium*, se podrían generar fusiones de ambos efectores a reporteros fluorescentes como GFP mediante el clonamiento de sus marcos de lectura en vectores plasmidiales, tal como se hizo con Rab32A (**Fig. 14**). Estas construcciones permitirían la expresión heteróloga de los efectores en *D. discoideum* para determinar si producen algún fenotipo o alteración celular en la ameba. Además, al ser fusiones acopladas a un reportero fluorescente, se podría evaluar la localización subcelular de GtgE y SopD2 en *D. discoideum* e incluso, determinar si los efectores colocalizan con Rab32A usando fusiones de la GTPasa a alguna proteína fluorescente adecuada (e.g., mCherry). Esto también permitiría determinar si el patrón de distribución subcelular de Rab32A (**Fig. 14**) se perturba en presencia de los efectores sin la necesidad de realizar infecciones con las distintas cepas de *S. Typhimurium* (ve **Sección 11.3**). Esta estrategia también se podría emplear para caracterizar la localización subcelular de las otras proteínas Rab32 de *D. discoideum* durante su interacción con *S. Typhimurium*.

Con la finalidad de evaluar la contribución de SopD2 en la proteólisis de Rab32A por parte de GtgE, en nuestro laboratorio se ha purificado dicha GTPasa y ambos efectores para realizar ensayos de proteólisis *in vitro*. Por su parte, mediante ensayos de proteólisis *in vitro* y de co-expresión heteróloga en *E. coli* (ver **Sección 11.4**) será posible evaluar si GtgE también proteoliza a las otras proteínas Rab32 codificadas en el genoma de la ameba. Adicionalmente, se podría evaluar la interacción de GtgE y SopD2 con Rab32A y con las otras proteínas Rab32 de *D. discoideum* mediante análisis de doble híbrido en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, técnica que se ha implementado recientemente en nuestro laboratorio.

14.- CONCLUSIONES

1. Las 4 proteínas Rab32 codificadas en el genoma de *D. discoideum* comparten una alta similitud de secuencia aminoacídica con proteínas Rab32 de mamíferos y son sustratos potenciales de la actividad proteolítica del efector GtgE de *S. Typhimurium*.
2. La proteína Rab32A de *D. discoideum* tiene una mayor cercanía filogenética con las proteínas Rab32 de origen mamífero que a las otras proteínas Rab32 codificadas en el genoma de la ameba.
3. Los efectores GtgE y SopD2 de *S. Typhimurium* contribuyen a la supervivencia intracelular y virulencia de la bacteria durante la infección de *D. discoideum*.
4. La proteína Rab32A se asocia a compartimientos membranosos intracelulares en *D. discoideum*. Si bien se observó que esta GTPasa es reclutada hacia la SCV, no se logró determinar si los efectores GtgE y SopD2 son capaces de interferir en dicho proceso bajo las condiciones experimentales analizadas.
5. El efector GtgE de *S. Typhimurium* proteoliza a la GTPasa Rab32A de *D. discoideum*. Sin embargo, no se pudo determinar la contribución de SopD2 en este proceso.

15.- REFERENCIAS

- Aktorics, K. (2011). Bacterial protein toxins that modify host regulatory GTPases. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**: 487–498.
- Alexandrov, K, Wu, Y., Blankenfeldt W., Waldmann, H. & Goody, R. S. (2011). 8 - Organization and function of the Rab prenylation and recycling machinery. *The Enzymes.* **29**: 147 –162.
- Alpuche-Aranda, C., Racoosin, E., Swanson, J. & Miller, S. (1994). Salmonella stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J. Exp. Med.* **179**: 601–608.
- Alto, N. M., Soderling, J. & Scott, J. D. (2002) Rab32 is an A-kinase anchoring protein and participates in mitochondrial dynamics. *J. Cell Biol.* **158**: 659e68.
- Amaya, F. A., Blondel, C. J., Barros-Infante, M. F., Rivera, D., Moreno-Switt, A. I., Santiviago, C. A. & Pezoa, D. (2022). Identification of type VI secretion systems effector proteins that contribute to interbacterial competition in *Salmonella* Dublin. *Front Microbiol.* **13**: 811932.
- Armougom, F., Moretti, S., Poirot, O., Audic, S., Dumas, P., Schaeli, B., Keduas, V. & Notredame, C. (2006). Expresso: automatic incorporation of structural information in multiple sequence alignments using 3D-Coffee. *Nucleic Acids Res.* **34**(Web Server issue): W604–608.
- Bakowski, M. A., Cirulis, J. T., Brown, N. F., Finlay, B. B. & Brumell, J. H. (2007). SopD acts cooperatively with SopB during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion. *Cell. Microbiol.* **9**(12): 2839–2855.
- Bakowski, M., Braun, V., Lam, G., Yeung, T., Heo, W., Meyer, T., Finlay, B., Grinstein, S. & Brumell, J. (2010). The phosphoinositide phosphatase SopB manipulates membrane surface charge and trafficking of the *Salmonella*-containing vacuole. *Cell Host Microbe.* **7**:453–462.
- Benado, A., Nasagi-Atiya, Y. & Sagi-Eisenberg, R. (2009). Protein trafficking in immune cells. *Immunobiology.* **214**: 507–525.
- Bleasdale, B., Lott, P., Jagannathan, A., Stevens, M., Birtles, R. & 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**: 1793–1795.
- Blondel, C. J., Jiménez, J. C., Contreras, I. & Santiviago, C. A. (2009). Comparative genomic analysis uncovers 3 novel loci encoding type six secretion systems differentially distributed in *Salmonella* serotypes. *BMC Genomics.* **10**: 354.
- Boddy, K. C., Zhu, H., D'Costa, V. M., Xu, C., Beyrakhova, K., Cygler, M., Grinstein, S., Coyaud, E., Laurent, E. M. N., St-Germain, J., Raught, B. & Brumell, J. H. (2021) *Salmonella* effector SopD promotes plasma membrane scission by inhibiting Rab10. *Nat. Commun.* **12**(1): 4707.
- Boulais, J., Trost, M., Landry, C. R., Dieckmann, R., Levy, E. D., Soldati, T., Michnick, S. W., Thibault, P. & Desjardins, M. (2010). Molecular characterization of the evolution of phagosomes. *Mol. Syst. Biol.* **6**: 423.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**(1–2): 248–254.
- Brandl, M., Rosenthal, B., Haxo, A. & Berk, S. (2005). Enhanced survival of *Salmonella enterica* in vesicles released by a soilborne Tetrahymena species. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 1562–1569.
- Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R. & Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 2465–2467.

- Brumell, J. H., Kujat-Choy, S., Brown, N. F., Vallance, B. A., Knodler, L. A. & Finlay, B. B. (2003). SopD2 is a novel type III secreted effector of *Salmonella* typhimurium that targets late endocytic compartments upon delivery into host cells. *Traffic*. **4**(1): 36–48.
- Brunet, Y. R., Khodr, A., Logger, L., Aussel, L., Mignot, T., Rimsky, S. & Cascales, E. (2015). H-NS silencing of the *Salmonella* pathogenicity island 6-encoded type VI secretion system limits *Salmonella enterica* serovar Typhimurium interbacterial killing. *Infect Immun*. **83**(7): 2738–50.
- Bui, M., Gilady, S. Y., Fitzsimmons, R. E. B., Benson, M. D., Lynes, E. M., Gesson, K., Alto, N. M., Strack, S., Scott, J. D. & Simmen, T. (2010). Rab32 modulates apoptosis onset and mitochondria-associated membrane (MAM) properties. *J. Biol. Chem*. **285**: 31590e602.
- Bultema, J. J., Ambrosio, A. L., Burek, C. L. & Di Pietro, S. M. (2012). BLOC-2, AP-3, and AP-1 proteins function in concert with Rab38 and Rab32 proteins to mediate protein trafficking to lysosome-related organelles. *J. Biol. Chem*. **287**: 19550–19563.
- Canals, R., McClelland, M., Santiviago, C. & Andrews-Polymenis H. (2011). "Genomics of *Salmonella* species" In "Genomics of Foodborne Pathogens". Wei Zhang and Martin Wiedmann (Eds). Springer New York, pp 171-235.
- Carrol, M., Jackett, P., Aber, V. & Lowrie, D. (1979). Phagolysosome formation, cyclic adenosine 3':5'-monophosphate and the fate of *Salmonella* typhimurium within mouse peritoneal macrophages. *J. Gen. Microbiol*. **110**: 421–429.
- Chen, M., Sun, H., Boot, M., Shao, L., Chang, S. J., Wang, W., Lam, T. T., Lara-Tejero, M., Rego, E. H., Galán, J. E. (2020). Itaconate is an effector of a Rab GTPase cell-autonomous host defense pathway against *Salmonella*. *Science*. **369**(6502): 450–455.
- Cherfils, J. & Zeghouf, M. (2013). Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol. Rev*. **93**: 269–309.
- Cossart, P. & Roy, C. R. (2010). Manipulation of host membrane machinery by bacterial pathogens. *Curr. Opin. Cell Biol*. **22**: 547–54.
- Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**: 6640–6645.
- D'Costa, V. M., Braun, V., Landekic, M., Shi, R., Proteau, A., McDonald, L., Cygler, M., Grinstein, S. & Brumell, J. H. (2015). *Salmonella* disrupts host endocytic trafficking by SopD2-mediated inhibition of Rab7. *Cell Rep*. **12**(9): 1508–1518.
- Dell'Angelica, E. C. (2004). The building BLOC(k)s of lysosomes and related organelles. *Curr. Opin. Cell Biol*. **16**: 458–464.
- Desai, P. T., Porwollik, S., Long, F., Cheng, P., Wollam, A., Bhonagiri-Palsikar, V., Hallsworth-Pepin, K., Clifton, S. W., Weinstock, G. M. & McClelland, M. (2013). Evolutionary genomics of *Salmonella enterica* subspecies. *mBio*. **4**: e00198–13.
- Di Tommaso, P., Moretti, S., Xenarios, I., Oorbitg, M., Montanyola, A., Chang, J. M., Taly, J. F. & Notredame, C. (2011). T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Res*. **39**(Web Server issue): W13-7.
- Drecktrah, D., Knodler, L., Howe, D. & Steele-Mortimer, O. (2007). *Salmonella* trafficking is defined by continuous dynamic interactions with the endolysosomal system. *Traffic*. **8**: 212–225.
- Duhon, D. & Cardelli, J. (2002). The regulation of phagosome maturation in *Dictyostelium*. *J. Muscle Res. Cell Motil*. **23**: 803–808.
- Feng, Y., Hsiao, Y., Chen, H., Chu, C., Tang, P. & Chiu, C. (2009). Apoptosis-like cell death induced by *Salmonella* in *Acanthamoeba* rhysodes. *Genomics*. **94**: 132–137.

- Fernández, P. A., Zabner, M., Ortega, J., Morgado, C., Amaya, F., Vera, G., Rubilar, C., Salas, B., Cuevas, V., Valenzuela, C., Baisón-Olmo, F., Álvarez, S. A. & Santiviago, C. A. (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.
- Fey, P., Dodson, R. J., Basu, S. & Chisholm, R. L. (2013). One stop shop for everything Dictyostelium: dictyBase and the Dicty Stock Center in 2012. *Methods Mol Biol*. **983**: 59–92.
- Fields, P., Swanson, R., Haidaris, C. & Heffron, F. (1986). Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **83**: 5189–5193.
- Fierer, J. & Guiney, D. G. (2001). Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. *J. Clin. Invest*. **107**: 775–780.
- Figueira, R., Watson, K. G., Holden, D. W. & 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.
- Flowers, J. M., Li, S. I., Stathos, A., Saxer, G., Ostrowski, E. A., Queller, D. C., Strassmann, J. E. & Purugganan, M. D. (2010). Variation, sex, and social cooperation: molecular population genetics of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *PLoS Genet*. **6**(7): e1001013.
- Frederiksen, R. & Leisner, J. (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**: fnv067.
- Freter, R., Allweiss, B., O'Brien, P. C., Halstead, S. A. & Macsai, M. S. (1981). Role of chemotaxis in the association of motile bacteria with intestinal mucosa: *in vitro* studies. *Infect. Immun*. **34**: 241–249.
- Galán, J. E. & Curtiss, R. (1989). Cloning and molecular characterisation of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**: 6383–6387.
- Gao, L., Harb, O. & Abu Kwaik, Y. (1997). Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa. *Infect. Immun*. **65**: 4738–4746.
- García-del Portillo, F. & Finlay, B. B. (1995). Targeting of *Salmonella typhimurium* to vesicles containing lysosomal membrane glycoproteins bypasses compartments with mannose 6-phosphate receptors. *J. Cell Biol*. **129**(1): 81–97.
- García-del Portillo, F., Foster, J. W. & Finlay, B. B. (1993). Role of acid tolerance response genes in *Salmonella typhimurium* virulence. *Infect. Immun*. **61**: 4489–4492.
- Gaze, W., Burroughs, N., Gallagher, M. & Wellington, M. (2003). Interactions between *Salmonella typhimurium* and *Acanthamoeba polyphaga*, and observation of a new mode of intracellular growth within contractile vacuoles. *Microb. Ecol*. **46**: 358–369.
- Gotthardt, D., Blancheteau, V., Bosserhoff, A., Ruppert, T., Delorenzi, M. & Soldati, T. (2006). Proteomics fingerprinting of phagosome maturation and evidence for the role of a Gα during uptake. *Mol. Cell Proteomics*. **5**(12): 2228–2243.
- Gourabathini, P., Brandl, M. T., Redding, K. S., Gunderson, J. H. & Berk, S. G. (2008). Interactions between foodborne pathogens and protozoa isolated from lettuce and spinach. *Appl. Environ. Microbiol*. **74**: 2518–2525.
- Guard-Petter, J. (2001). The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. *Environ. Microbiol*. **3**: 421–430.

- Hardt, W., Chen, L., Schuebel, K., Bustelo, X. & Galán, J. (1998). *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell*. **93**: 815–826.
- Hensel, M., Shea, J. E., Gleeson, C., Jones, M. D., Dalton, E. & Holden, D. W. (1995). Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science*. **269**: 400–403.
- Hensel, M., Shea, J. E., Waterman, S. R., Mundy, R., Nikolaus, T., Banks, G., Vazquez-Torres, A., Gleeson, C., Fang, F. C. & Holden, D. W. (1998). Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol. Microbiol.* **3**: 163–174.
- Hernandez, L., Hueffer, K., Wenk, M. & Galán, J. (2004). *Salmonella* modulates vesicular traffic by altering phosphoinositide metabolism. *Science*. **304**: 1805–1807.
- Hirota, Y. & Tanaka, Y. (2009). A small GTPase, human Rab32, is required for the formation of autophagic vacuoles under basal conditions. *Cell Mol. Life Sci.* **66**: 2913e32.
- Ho, T. D., Figueroa-Bossi, N., Wang, M., Uzzau, S., Bossi, L. & Slauch, J. M. (2002). Identification of GtgE, a novel virulence factor encoded on the Gifsy-2 bacteriophage of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* **184**(19): 5234–5239.
- Hoffmann, C., Finsel, I., Otto, A., Pfaffinger, G., Rothmeier, E., Hecker, M., Becher, D. & Hilbi, H. (2014). Functional analysis of novel Rab GTPases identified in the proteome of purified *Legionella*-containing vacuoles from macrophages. *Cell Microbiol.* **16**(7): 1034–52.
- Izore, T., Job, V. & Dessen, A. (2011). Biogenesis, regulation, and targeting of the type III secretion system. *Structure*. **19**: 603–612.
- Jahn, M., Vorpahl, C., Hübschmann, T., Harms, H. & Müller, S. (2016). Copy number variability of expression plasmids determined by cell sorting and Droplet Digital PCR. *Microb. Cell Fact.* **15**(1): 211.
- Jennings, E., Thurston, T. L. M. & Holden, D. W. (2017). *Salmonella* SPI-2 type III secretion system effectors: molecular mechanisms and physiological consequences. *Cell Host Microbe*. **22**(2): 217–231.
- 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. USA*. **106**: 14564–14569.
- Jiang, X., Rossanese, O., Brown, N., Kujat-Choy, S., Galán, J., Finlay, B. & Brumell, J. (2004). The related effector proteins SopD and SopD2 from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium contribute to virulence during systemic infection of mice. *Mol. Microbiol.* **54**: 1186–1198.
- Jones, B. D., Ghori, N. & Falkow, S. (1994). *Salmonella* typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J. Exp. Med.* **180**: 15–23.
- Jones, M. A., Wood, M. W., Mullan, P. B., Watson, P. R., Wallis, T. S. & Galyov, E. E. (1998). Secreted effector proteins of *Salmonella* dublin act in concert to induce enteritis. *Infect. Immun.* **66**(12): 5799–5804.
- Klöpper, T. H., Kienle, N., Fasshauer, D. & Munro, S. (2012). Untangling the evolution of Rab G proteins: implications of a comprehensive genomic analysis. *BMC Biol.* **10**: 71.
- Knecht, D. A., Cohen, S. M., Loomis, W. F. & Lodish, H. F. (1986). Developmental regulation of *Dictyostelium discoideum* actin gene fusions carried on low-copy and high-copy transformation vectors. *Mol. Cell Biol.* **6**(11): 3973–3983.

- Kohler, A. C., Spanò, S., Galán, J. E. & Stebbins, C. E. (2014) Structural and enzymatic characterization of a host-specificity determinant from *Salmonella*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **70**(2): 384–391.
- Koller, B., Schramm, C., Siebert, S., Triebel, J., Deland, E., Pfefferkorn, A. M., Rickerts, V. & Thewes, S. (2016). *Dictyostelium discoideum* as a novel host system to study the interaction between phagocytes and yeasts. *Front. Microbiol.* **7**: 1665.
- Levi, S., Polyakov, M. & Egelhoff, T. T. (2000). Green fluorescent protein and epitope tag fusion vectors for *Dictyostelium discoideum*. *Plasmid.* **44**: 231–238.
- Li, Y., Wang, Y., Zou, L., Tang, X., Yang, Y., Ma, L., Jia, Q., N. Q., Liu, S., Tang, L., Lin, R., Wong, E., Sun, W., Wang, L., Wei, Q., Ran, H., Zhang, L., Lian, H., Huang, W., Wu, Y., Li, Q. J. & Wan, Y. (2016). Analysis of the Rab GTPase interactome in dendritic cells reveals anti-microbial functions of the Rab32 complex in bacterial containment. *Immunity.* **44**(2): 422–437.
- Lian, H., Jiang, K., Tong, M., Chen, Z., Liu, X., Galán, J. E. & Gao, X. (2021). The *Salmonella* effector protein SopD targets Rab8 to positively and negatively modulate the inflammatory response. *Nat. microbiol.* **6**(5): 658–671.
- Luzio, J. P., Hackmann, Y., Dieckmann, N. M. & Griffiths, G. M. (2014). The biogenesis of lysosomes and lysosome-related organelles. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**: a016840.
- Maniak, M. (2002). Conserved features of endocytosis in *Dictyostelium*. *Int. Rev. Cytol.* **221**: 257–287.
- Marcus, S. L., Brumell, J. H., Pfeifer, C. G. & Finlay, B. B. (2000). *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect.* **2**: 145–156.
- McCormick, B. A., Miller, S. I., Carnes, D. & Madara, J. L. (1995). Transepithelial signaling to neutrophils by Salmonellae: a novel virulence mechanism for gastroenteritis. *Infect. Immun.* **63**: 2302–2309.
- McGourty, K., Thurston, T. L., Matthews, S. A., Pinaud, L., Mota, L. J. & Holden, D. W. (2012). *Salmonella* inhibits retrograde trafficking of mannose-6-phosphate receptors and lysosome function. *Science.* **338**: 963–967.
- McQuiston, J. R., Herrera-Leon, S., Wertheim, B. C., Doyle, J., Fields, P. I., Tauxe, R. V. & Logsdon, J. M. (2008). Molecular phylogeny of the Salmonellae: Relationships among *Salmonella* species and subspecies determined from four housekeeping genes and evidence of lateral gene transfer events. *J. Bacteriol.* **190**: 7060–7067.
- Mesquita, A., Tábara, L. C., Martínez-Costa, O., Santos-Rodrigo, N., Vincent, O. & Escalante, R. (2015). Dissecting the function of Atg1 complex in *Dictyostelium* autophagy reveals a connection with the pentose phosphate pathway enzyme transketolase. *Open Biol.* **5**(8): 150088.
- Morgado, C. (2021). Participación del efector SseJ en la supervivencia intracelular de *Salmonella* Typhimurium en *Dictyostelium discoideum*. Disponible en <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/185537>
- Müller-Taubenberger, A., Kortholt, A. & Eichinger, L. (2013). Simple system substantial share: the use of *Dictyostelium* in cell biology and molecular medicine. *Eur. J. Cell. Biol.* **92**(2):45–53.
- Norian, L., Dragoi, I. & O'Halloran, T. (1999). Molecular characterization of *rabE*, a developmentally regulated *Dictyostelium* homolog of mammalian Rab GTPases. *DNA Cell Biol.* **18**(1): 59–64.
- Ochman, H., Soncini, F. C., Solomon, F. & Groisman, E. A. (1996) Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **93**: 7800–7804.

- Ortega, J. (2021). Contribución de los efectores SipA, SseF y SseG en la supervivencia intracelular de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en *Dictyostelium discoideum* [Internet]. Santiago, Chile: Universidad de Chile - Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas [citado: 2019, noviembre]. Disponible en <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/181520>
- Ortiz-Sandoval, C. G., Hughes, S. C., Dacks, J. B. & Simmen, T. (2014). Interaction with the effector dynamin-related protein 1 (Drp1) is an ancient function of Rab32 subfamily proteins. *Cell. Logist.* **4**: e986399.
- Patel, J. & Galán, J. (2006). Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. *J. Cell Biol.* **175**: 453–463.
- Pezoa, D., Blondel, C. J., Silva, C. A., Yang, H. J., Andrews-Polymeris, H., Santiviago, C. A. & Contreras, I. (2014). Only one of the two type VI secretion systems encoded in the *Salmonella enterica* serotype Dublin genome is involved in colonization of the avian and murine hosts. *Vet Res.* **45**(1): 2.
- Pfeffer, S. R. (2013). Rab GTPase regulation of membrane identity. *Curr. Opin. Cell Biol.* **25**(4): 414–419.
- Popoff, M. Y., (2001). Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 8th edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris, France.
- Popoff, M. Y., Bockemühl, J. & Gheesling, L. L. (2004). Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Res. Microbiol.* **155**(7): 568–570.
- Portaliou, A. G., Tsolis, K. C., Loos, M. S., Zorzini, V. & Economou, A. (2016). Type III secretion: building and operating a remarkable nanomachine. *Trends Biochem. Sci.* **41**: 175–189.
- Reh fuss, M., Parker, C. & Brandl, M. (2011). *Salmonella* transcriptional signature in Tetrahymena phagosomes and role of acid tolerance in passage through the protist. *ISME J.* **5**: 262–273.
- Richter-Dahlfors, A., Buchan, A. & Finlay, B. (1997). Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella typhimurium* resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes *in vivo*. *J. Exp Med.* **186**: 569–580.
- Riquelme, S., Varas, M., Valenzuela, C., Velozo, P., Chahin, N., Aguilera, P., Sabag, A., Labra, B., Álvarez, S., Chávez, F. & Santiviago, C. (2016). Relevant genes linked to virulence are required for *Salmonella Typhimurium* to survive intracellularly in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Front. Microbiol.* **7**: 1305.
- Sabag, A. (2017). Análisis comparativo de los genes involucrados en la supervivencia intracelular de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en macrófagos murinos y en la ameba *Dictyostelium discoideum* [Internet]. Santiago, Chile: Universidad de Chile - Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas [citado: 2019, noviembre]. Disponible en: <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/151424>
- Sana, T. G., Flaugnatti, N., Lugo, K. A., Lam, L. H., Jacobson, A., Baylot, V., Durand, E., Journet, L., Cascales, E. & Monack, D. M. (2016). *Salmonella Typhimurium* utilizes a T6SS-mediated antibacterial weapon to establish in the host gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **113**(34): e5044–51.
- Santiviago, C. A., Reynolds, M. M., Porwollik, S., Choi, S. H., Long, F., Andrews-Polymeris, H. L. & 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.
- Santos, J. C. & Enninga, J. (2016). At the crossroads: communication of bacteria-containing vacuoles with host organelles. *Cell Microbiol.* **18**(3): 330–339.

- Santos, R. L., Zhang, S., Tsohis, R. M., Kingsley, R. A., Adams, L. G. & Baumler, A. J. (2001). Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes Infect.* **3**: 1335–1344.
- Savitskiy, S. & Itzen, A. (2021). SopD from *Salmonella* specifically inactivates Rab8. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* **1869**(8): 140661.
- Savitskiy, S., Wachtel, R., Pourjafar-Dehkordi, D., Kang, H. S., Trauschke, V., Lamb, D. C., Sattler, M., Zacharias, M. & Itzen, A. (2020). Proteolysis of Rab32 by *Salmonella* GtgE induces an inactive GTPase conformation. *iScience.* **24**(1): 101940.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* **9**(7): 676–682.
- Schmölders, J., Manske, C., Otto, A., Hoffmann, C., Steiner, B., Welin, A., Becher, D. & Hilbi, H. (2017). Comparative Proteomics of Purified Pathogen Vacuoles Correlates Intracellular Replication of *Legionella pneumophila* with the Small GTPase Ras-related protein 1 (Rap1). *Mol. Cell Proteomics.* **16**(4): 622–641.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* **9**(7): 671–675.
- Schroeder, N., Henry, T., de Chastellier, C., Zhao, W., Guilhon, A. A., Gorvel, J. P. & Méresse, S. (2010). The virulence protein SopD2 regulates membrane dynamics of *Salmonella*-containing vacuoles. *PLoS Pathog.* **6**(7): e1001002.
- Schroll, C., Huang, K., Ahmed, S., Kristensen, B. M., Pors, S. E., Jelsbak, L., Lemire, S., Thomsen, L. E., Christensen, J. P., Jensen, P. R. & Olsen, J. E. (2019). The SPI-19 encoded type-six secretion-systems (T6SS) of *Salmonella enterica* serovars Gallinarum and Dublin play different roles during infection. *Vet. Microbiol.* **230**: 23–31.
- Segal, G. & Shuman, H. (1999). *Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages. *Infect. Immun.* **67**: 2117–2124.
- Seto, S., Tsujimura, K. & Koide, Y. (2011). Rab GTPases regulating phagosome maturation are differentially recruited to mycobacterial phagosomes. *Traffic.* **12**: 407–420.
- Shea, J. E., Hensel, M., Gleeson, C. & Holden, D. W. (1996). Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **93**: 2593–2597.
- 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**:1793–1811.
- Sinnott, C. R. & Teall, A. J. (1987). Persistent gallbladder carriage of *Salmonella typhi*. *Lancet.* **1**: 976.
- Smith, A. C., Cirulis, J. T., Casanova, J. E., Scidmore, M. A. & Brumell, J. H. (2005). Interaction of the *Salmonella*-containing vacuole with the endocytic recycling system. *J. Biol. Chem.* **280**: 24634–24641.
- Smith, A. C., Heo, W. D., Braun, V., Jiang, X., Macrae, C., Casanova, J. E., Scidmore, M. A., Grinstein, S., Meyer, T. & Brumell, J. H. (2007). A network of Rab GTPases controls phagosome maturation and is modulated by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Cell. Biol.* **176**: 263–268.
- Solano-Collado, V., Rofe, A. & Spanò, S. (2018). Rab32 restriction of intracellular bacterial pathogens. *Small GTPases.* **9**(3): 216–223.

- Sory, M. P., Boland, A., Lambermont, I. & Cornelis, G. R. (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. USA*. **92**: 11998–12002.
- Spanò, S. & Galán, J. E. (2012). A Rab32-dependent pathway contributes to *Salmonella* Typhi host restriction. *Science*. **338**: 960–963.
- Spanò, S. & Galán, J. E. (2013). A novel anti-microbial function for a familiar Rab GTPase. *Small GTPases*. **4**(4): 252–254.
- Spanò, S. & Galán, J. E. (2018). Taking control: Hijacking of Rab GTPases by intracellular bacterial pathogens. *Small GTPases*. **9**(1-2): 182–191.
- Spanò, S. (2014). Host restriction in *Salmonella*: insights from Rab GTPases. *Cell Microbiol*. **16**(9): 1321–1328.
- Spanò, S., Gao, X., Hannemann, S., Lara-Tejero, M. & Galán, J. E. (2016). A bacterial pathogen targets a host Rab-family GTPase defense pathway with a GAP. *Cell Host Microbe*. **19**: 216–226.
- Spanò, S., Liu, X. & Galán, J. E. (2011). Proteolytic targeting of Rab29 by an effector protein distinguishes the intracellular compartments of human-adapted and broad-host *Salmonella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **108**(45): 18418–18423.
- Spanò, S., Ugalde, J. E. & Galán, J. E. (2008). Delivery of a *Salmonella* Typhi exotoxin from a host intracellular compartment. *Cell Host Microbe*. **3**: 30–38.
- Steele-Mortimer, O., Meresse, S., Gorvel, J., Toh, B. & Finlay, B. (1999). Biogenesis of *Salmonella* typhimurium containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway. *Cell Microbiol*. **1**: 33–49.
- Steinert, M. (2011). Pathogen-host interactions in *Dictyostelium*, *Legionella*, *Mycobacterium* and other pathogens. *Semin. Cell Dev. Biol*. **22**: 70–76.
- Tang, B. L. (2016). Rab32/38 and the xenophagic restriction of intracellular bacteria replication. *Microbes Infect*. **18**(10): 595–603.
- Teo, W. X., Yang, Z., Kerr, M. C., Luo, L., Guo, Z., Alexandrov, K., Stow, J. L. & Teasdale, R. D. (2017). *Salmonella* effector SopD2 interferes with Rab34 function. *Cell. Biol. Int*. **41**(4): 433–446.
- Tezcan-Merdol, D., Ljungström, M., Winiacka-Krusnell, J., Linder, E., Engstrand, L. & Rhen, M. (2004). Uptake and Replication of *Salmonella enterica* in *Acanthamoeba rhyodes*. *Appl. Environ. Microbiol*. **70**: 3706–3714.
- Urrutia, I. (2019). Contribución de los factores de virulencia SopB, SptP y PphB de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en la modulación del proceso de autofagia en la ameba *Dictyostelium discoideum* y en macrófagos murinos [Internet]. Santiago, Chile: Universidad de Chile - Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas [citado: 2019, noviembre].
- Urrutia, Í. M., Sabag, A., Valenzuela, C., Labra, B., Álvarez, S. A. & Santiviago, C. A. (2018). Contribution of the twin-arginine translocation system to the intracellular survival of *Salmonella* Typhimurium in *Dictyostelium discoideum*. *Front. Microbiol*. **9**: 3001.
- Vaerewijck, M. J. M., Baré, J., Lambrecht, E., Sabbe, K. & Houf, K. (2014). Interactions of foodborne pathogens with free-living protozoa: potential consequences for food safety. *Compr. Rev. Food Sci. F*. **13**(5): 924–944.
- Valenzuela, C. (2019). Role of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium effectors proteins SopB and SifA in the intracellular survival and modification of the vacuolar compartment in *Dictyostelium discoideum* [Internet]. Santiago, Chile: Universidad de Chile - Facultad de Ciencias [citado: 2019, noviembre]. Disponible en: <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/159544>

- Valenzuela, C., Gil, M., Urrutia, Í. M., Sabag, A., Enninga, J. & Santiviago, C. A. (2021) SopB- and SifA-dependent shaping of the *Salmonella*-containing vacuole proteome in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Cell Microbiol.* **23**(1): e13263.
- Varas, M. A., Riquelme-Barrios, S., Valenzuela, C., Marcoleta, A. E., Berríos-Pastén, C., Santiviago, C. A. & Chávez, F. P. (2018). Inorganic polyphosphate is essential for *Salmonella* Typhimurium virulence and survival in *Dictyostelium discoideum*. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **8**: 8.
- Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Bäumlér, A. J., Falkow, S., Valdivia, R., Brown, W., Le, M., Berggren, R., Parks, W. T. & Fang, F. C. (1999). Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature.* **401**: 804–808.
- Veltman, D. M., Akar, G., Bosgraaf, L. & Van Haastert, P. J. (2009a) A new set of small, extrachromosomal expression vectors for *Dictyostelium discoideum*. *Plasmid.* **61**(2): 110–118.
- Veltman, D. M., Keizer-Gunnink, I. & Haastert, P. J. (2009b). An extrachromosomal, inducible expression system for *Dictyostelium discoideum*. *Plasmid.* **61**(2): 119–125.
- Vera, G. (2020). Contribución de la proteína efectora SopF en la supervivencia intracelular y virulencia de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en *Dictyostelium discoideum*.
- Verma, S. & Srikanth, C. (2015). Understanding the complexities of *Salmonella*-host crosstalk as revealed by in vivo model organisms. *IUBMB Life.* **67**: 482–497.
- Wachtel, R., Bräuning, B., Mader, S. L., Ecker, F., Kaila, V. R. I., Groll, M. & Itzen, A. (2018). The protease GtgE from *Salmonella* exclusively targets inactive Rab GTPases. *Nat. Commun.* **9**: 44.
- Wain, J., Pham, V. B., Ha, V., Nguyen, N. M., To, S. D., Walsh, A. L., Parry, C. M., Hasserjian, R. P., HoHo, V. A., Tran, T. H., Farrar, J., White, N. J. & Day, N. P. (2001). Quantitation of bacteria in bone marrow from patients with typhoid fever: relationship between counts and clinical features. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 1571–1576.
- Walker, I. H., Hsieh, P. C. & Riggs, P. D. (2010). Mutations in maltose-binding protein that alter affinity and solubility properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **88**(1): 187–97.
- Wang, C., Liu, Z. & Huang, X. (2012). Rab32 is important for autophagy and lipid storage in *Drosophila*. *PLoS One.* **7**: e32086.
- Wasmeier, C., Romao, M., Plowright, L., Bennett, D. C., Raposo, G. & Seabra, M. C. (2006). Rab38 and Rab32 control post-Golgi trafficking of melanogenic enzymes. *J. Cell. Biol.* **175**: 271–281.
- Weber, S., Wagner, M., & Hilbi, H. (2014). Live-cell imaging of phosphoinositide dynamics and membrane architecture during *Legionella* infection. *mBio.* **5**: e00839–e00813.
- Xu, C., Kozlov, G., Wong, K., Gehring, K. & Cygler, M. (2016). Crystal structure of the *Salmonella* Typhimurium effector GtgE. *PLoS ONE.* **11**(12): e0166643.
- Zabner, M. (2022). Contribución del efector SopB a la maduración de la Vacuola Contenedora de *Salmonella* en *Dictyostelium discoideum* y su rol en el remodelamiento de la vía endocítica del hospedero. Disponible en <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/191422>
- Zhang, F., Liu, H., Chen, S., Low, H., Sun, L., Cui, Y., Chu, T., Li, Y., Fu, X., Yu, Y., Yu, G., Shi, B., Tian, H., Liu, D., Yu, X., Li, J., Lu, N., Bao, F., Yuan, C., Liu, J., Liu, H., Zhang, L., Sun, Y., Chen, M., Yang, Q., Yang, H., Yang, R., Zhang, L., Wang, Q., Liu, H., Zuo, F., Zhang, H., Khor, C. C., Hibberd, M. L., Yang, S., Liu, J., Zhang, X. (2011). Identification of two new loci at IL23R and RAB32 that influence susceptibility to leprosy. *Nat. Genet.* **43**: 1247–1251.
- Zhen, Y. & Stenmark, H. (2015). Cellular functions of Rab GTPases at a glance. *J. Cell Sci.* **128**: 3171–3176.

16.-ANEXOS

16.1.- Proteínas de fusión de los efectores GtgE y SopD2 con el reportero CyaA'

A fin de determinar si los efectores GtgE y SopD2 de *S. Typhimurium* son efectivamente producidos y translocados hacia *D. discoideum* durante la infección, se generaron proteínas de fusión para ambos efectores acoplándolos al reportero enzimático CyaA'. Este reportero corresponde al dominio catalítico adenilato-ciclasa dependiente de calmodulina de la toxina CyaA de *Bordetella pertussis* (Sory *et al.*, 1995). El dominio CyaA' se anexó genéticamente al extremo C-terminal de las proteínas GtgE y SopD2 a través de una fusión cromosómica. Para esto, un fragmento de DNA que codifica al reportero CyaA' se introdujo en el cromosoma de *S. Typhimurium* 14028s inmediatamente río abajo de los genes *gtgE* y *sopD2* continuando su marco de lectura. Esta mutagénesis se efectuó mediante el método de Red-Swap (Datsenko & Wanner, 2000), con modificaciones. El fragmento de DNA para el reemplazo alélico se amplificó por PCR desde el plasmidio pCyaA'-Kan, el cual fue construido por nuestro grupo como parte de una metodología para generar fusiones cromosómicas a CyaA' (Fernández *et al.*, 2021). La expresión de las proteínas de fusión GtgE-CyaA' y SopD2-CyaA' se determinó mediante *Western blot* en lisados celulares de las correspondientes mutantes de *S. Typhimurium* cultivadas en condiciones que inducen la expresión de genes asociados a las islas de patogenicidad SPI-1 y SPI-2 (**Fig. 17**). La producción de ambas proteínas de fusión se observó como la aparición de una banda discreta que presentaba un peso molecular compatible con la estimación teórica en base a su secuencia aminoacídica (~70,66 KDa para GtgE-CyaA' y ~82,38 KDa para SopD2-CyaA'). En el caso de la mutante *gtgE-cyaA'* (**Fig. 17A**), se observaron múltiples bandas en los carriles de

la cepa silvestre (que no porta ninguna construcción CyaA') y de la mutante, pero sólo en esta última se detectó una banda que coincide con el tamaño de GtgE-CyaA'. Las bandas adicionales se pueden atribuir a interacciones inespecíficas de los anticuerpos con otras proteínas de la bacteria. Respecto a GtgE-CyaA', la proteína se detectó tanto en condiciones de crecimiento inductoras de genes asociados a la SPI-1 y a la SPI-2 (**Fig. 17A**), mientras que SopD2-CyaA' se detectó únicamente en condiciones inductoras de genes asociados a la SPI-2 (**Fig. 17B**). Estas observaciones concuerdan con el patrón de expresión descrito previamente en la literatura para ambos genes, donde la transcripción de *gtgE* se induce junto con SPI-1 y SPI-2, codificando un efector que puede ser translocado por el T3SS-1 y el T3SS-2 (Spanò *et al.*, 2011; Jennings *et al.*, 2017); al contrario de *sopD2* que se expresa sólo al inducir la SPI-2 y cuyo efector es translocado por el T3SS-2 (Brumell *et al.*, 2003). El tamaño de las proteínas de fusión y las condiciones en que se detectaron indican que las construcciones se generaron adecuadamente, expresándose bajo el control de los promotores nativos de los genes de interés en el cromosoma de *Salmonella*. Estos resultados forman parte de un artículo científico de nuestro laboratorio publicado en la revista *Microorganisms* (Fernández *et al.*, 2021), en el cual se describe el diseño de un método para generar fusiones cromosómicas de efectores de *Salmonella* al reportero CyaA' con la finalidad de evaluar su translocación hacia *D. discoideum* durante infecciones de la ameba. Este método también es válido para otros modelos bacterianos compatibles con la metodología mutagénesis dirigida *Red-Swap* (Datsenko & Wanner, 2000).

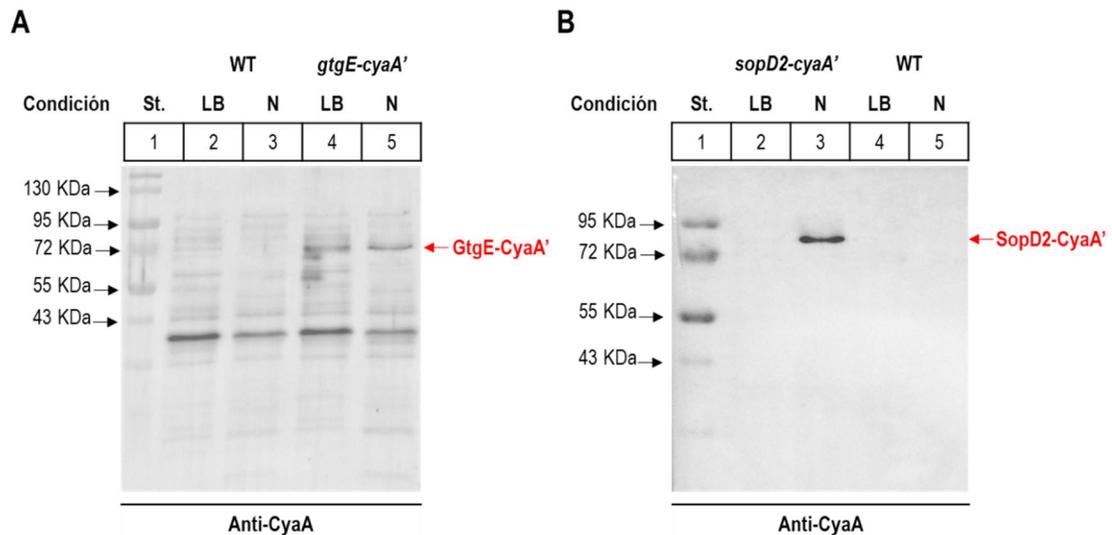


Figura 17. Inmunodetección de las proteínas de fusión GtgE-CyaA' y SopD2-CyaA' en *S. Typhimurium*. La expresión de las proteínas de fusión traduccional al reportero CyaA' para los efectores GtgE y SopD2, se detectaron mediante *Western blot* en lisados celulares de las mutantes cromosómicas *gtgE-cyaA'* (**A**) y *sopD2-cyaA'* (**B**) de *S. Typhimurium* cultivadas en condiciones inductoras de la SPI-1 (LB; caldo Luria Bertani suplementado con 0,3 M NaCl) y de la SPI-2 (N; medio mínimo N [(5 mM KCl; 0,5 mM (NH₄)₂SO₄; 0,5 mM K₂SO₄; 1 mM KH₂PO₄, 10 μM MgCl₂]) tamponado a pH 5,8 en 100 μM MES y suplementado con 0,4 % glucosa y 0,1 % casaminoácidos). La cepa silvestre 14028s de *S. Typhimurium*, que no contiene en su genoma las construcciones *gtgE-cyaA'* y *sopD2 cyaA'*, se incluyó como un control de especificidad para los anticuerpos utilizados. Ambas proteínas de fusión se observaron mediante la aparición de una banda discreta en un peso molecular compatible con el estimado *in silico* en base a su secuencia aminoacídica, siendo de ~70,66 KDa para GtgE-CyaA' y de ~82,38 KDa para SopD2-CyaA'. Como anticuerpo primario se usó el anticuerpo murino anti-CyaA' 3D1 (Santa Cruz Biotechnology) y como secundario, un anticuerpo IgG anti-ratón conjugado con la peroxidasa de rábano picante (Cell Signalling Technology). Ambos anticuerpos se usaron diluidos 1:10.000 en BSA 5 %.

16.2.- Identificación de nuevos módulos efector/proteína inmunidad de los sistemas de secreción de tipo VI de *Salmonella* Dublin que contribuyen en la competencia interbacteriana

Salmonella Dublin es un serotipo de *Salmonella* adaptado a hospederos bovinos. Entre sus principales factores de virulencia, cuenta con dos sistemas de secreción de tipo VI (T6SSs) codificados en las islas de patogenicidad SPI-6 (T6SS-6) y SPI-19 (T6SS-19) (Blondel *et al.*, 2009). Ambos T6SSs se han asociado a la virulencia y colonización de hospederos animales por parte de *S. Dublin* (Pezoa *et al.*, 2014; Schroll *et al.*, 2019),

pero no se ha establecido claramente su actividad antibacteriana en este serotipo. A través de ensayos de competencia dónde mutantes de *S. Dublin* CT_02021853 con delección de las islas SPI-6 y/o SPI-19 se co-incubaron con una cepa susceptible de *E. coli* como presa, se demostró que el T6SS-6 y T6SS-19 contribuyen en la competencia interbacteriana. Adicionalmente, mediante análisis bioinformáticos y de genómica comparativa se identificaron genes que codifican 3 potenciales efectores antibacterianos localizados dentro de SPI-6 y 2 efectores dentro de SPI-19. Cada uno de estos genes está localizado río arriba de un gen que codifica una proteína de inmunidad hipotética, conformando un módulo efector/proteína de inmunidad (E/I). Para determinar si algunos de estos módulos E/I contribuyen a la competencia interbacteriana mediada por los T6SSs en *S. Dublin*, se seleccionaron los módulos SED_RS01930/SED_RS01935 (codificado en SPI-6), SED_RS06235/SED_RS06230 y RS06335/SED_RS06340 (ambos codificados en SPI-19) para generar mutantes por delección no polar del gen que codifica el efector o del módulo E/I completo. Estas mutantes se sometieron a ensayos de competencia en distintas combinaciones de cepas presa y atacante, siendo co-incubadas en medio sólido en presencia de sales biliares, descritas como inductoras de los T6SSs y genes relacionados en *Salmonella* (Brunet *et al.*, 2014; Sana *et al.*, 2016; Schroll *et al.*, 2019). En todos los casos, la supervivencia de las mutantes que sólo carecen del gen que codifica al efector (conservando intacto el gen que codifica la proteína de inmunidad correspondiente), no fue afectada tras la co-incubación con la cepa silvestre de *S. Dublin* CT_02021853 (**Fig. 18**). Esto sugiere que la proteína de inmunidad podría contrarrestar la actividad tóxica de su respectivo efector translocado por la cepa atacante. Al contrario, las mutantes que carecen del módulo E/I completo mostraron una significativa reducción de su supervivencia tras la co-incubación con la cepa silvestre (**Fig. 18**). Finalmente, cuando las mutantes que carecen del gen

que codifica al efector se co-incubaron junto con la mutante que carece del módulo E/I correspondiente, se observó una supervivencia comparable para ambas cepas (**Fig. 18**). Estos resultados son una confirmación genética de que los módulos SED_RS01930/SED_RS01935, SED_RS06235/SED_RS06230 y RS06335/SED_RS06340 participan en la competencia interbacteriana mediada por los sistemas T6SS-6 y T6SS-19 en *S. Dublin* CT_02021853. Asimismo, los resultados indican que los genes SED_RS01930, SED_RS06235 y SED_RS06335 codifican efectores funcionales, mientras que SED_RS01935, SED_RS06230 y SED_RS06340 codifican sus respectivas proteínas de inmunidad. Este trabajo se desarrolló como una colaboración con el Dr. Carlos Blondel y el Dr. David Pezoa, siendo recientemente publicado en la revista *Frontiers in Microbiology* (Amaya *et al.*, 2022).

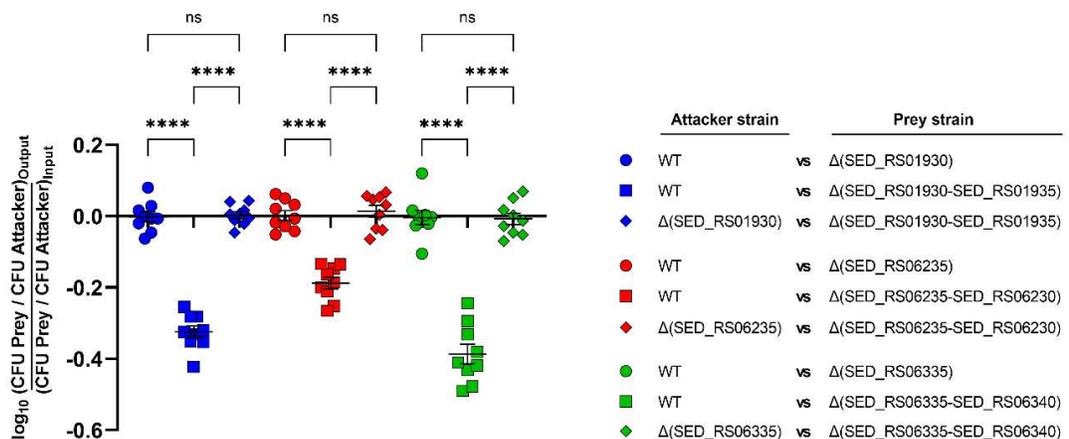


Figura 18. Contribución de nuevos pares efector/proteína inmunidad a la competencia interbacteriana en *S. Dublin*. Suspensiones bacterianas de la cepa atacante y presa se normalizaron por OD_{600nm} y se mezclaron en proporción 1:1. La mezcla se incubó a 37°C durante 24 h por triplicado sobre agar MacConkey. Los recuentos bacterianos provenientes de cada ensayo se calcularon por dilución seriada en base 10 e inoculación en agar LB. En el eje Y se muestra el logaritmo en base 10 del cociente de UFC entre la cepa presa y atacante normalizado por el cociente en el inóculo. Cada barra representa el promedio de 9 ensayos independientes ± SEM. La significancia estadística se determinó usando ANOVA de una vía seguido por la prueba de comparación múltiple de Tukey (**** $P < 0,0001$; ns: no significativo).

17.- PREMIOS, PUBLICACIONES & PRESENTACIONES

17.1.- Becas y premios

Premio Mejor Póster Congreso XLIV SOMICH 2022. Reconocimiento otorgado por la Sociedad de Microbiología de Chile (SOMICH) al mejor póster presentado durante la sesión de exposición de paneles en el congreso anual XLIV.

2022. Extensión Beca ANID para Tesis Doctoral. Beneficio complementario para la extensión del financiamiento otorgado por la beca ANID de Doctorado Nacional.

2021. Gastos Operacionales del Proyecto de Tesis Doctoral 242210239. ANID. Beneficio Complementario que otorga financiamiento para gastos por conceptos asociados al desarrollo del proyecto de tesis de doctorado.

2019 – 2022. Beca Doctorado Nacional 21191925. ANID (antes CONICYT). Financiamiento arancel doctorado y subsidio de manutención estudiantil.

17.2.- Publicaciones científicas

Blondel, C. J., **Amaya, F. A.**, Bustamante, P., Santiviago, C. A. & Pezoa, D. (2023). Identification and distribution of new candidate T6SS effectors encoded in *Salmonella* Pathogenicity Island 6. *Front. Microbiol.* **14**: 1252344. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1252344>

Pezoa, D., Blondel, C. J., **Amaya, F. A.** & Santiviago, C. A. (2023). Transfer of T6SS_{SPI-19} from *Salmonella* Gallinarum to *Salmonella* Typhimurium lacking T6SS_{SPI-6} complements its colonization defect in mice. *Pol. J. Microbiol.* **72**(2): 215-219. DOI: <https://doi.org/10.33073/pjm-2023-017>

Amaya, F. A., Blondel, C. J., Barros-Infante, M. F., Rivera, D., Moreno-Switt, A. I., Santiviago, C. A. & Pezoa, D. (2022). Identification of type VI secretion systems effector proteins that contribute to interbacterial competition in *Salmonella* Dublin. *Front. Microbiol.* **13**: 811932. DOI: [10.3389/fmicb.2022.811932](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.811932)

Fernández, P. A.; Zabner, M.; Ortega, J.; Morgado, C.; **Amaya, F.**; Vera, G.; Rubilar, C.; Salas, B.; Cuevas, V.; Valenzuela, C.; Baisón-Olmo, F.; Álvarez, S. A. & Santiviago, C. A. (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. DOI: [10.3390/microorganisms9030475](https://doi.org/10.3390/microorganisms9030475)

17.3.- Presentaciones en congresos científicos nacionales e internacionales

Amaya, F., Avilés, A., Osses, G., Álvarez, S. A. & Santiviago, C. A. Contribución del efector GtgE de *Salmonella Typhimurium* en la inactivación proteolítica y la distribución subcelular de la GTPasa monomérica Rab32A en la ameba *Dictyostelium discoideum*. XLV Congreso Chileno de Microbiología. Pucón, Chile. 04 al 07 de diciembre, 2023.

Calquín, C., Avilés, A., **Amaya, F.,** Álvarez, S. A. & Santiviago, C. A. **Construcción de plasmidios recombinantes para expresar, purificar y evaluar la actividad proteolítica *in vitro* del efector GtgE de *Salmonella Typhimurium* sobre la proteína Rab32A de *Dictyostelium discoideum*.** XLV Congreso Chileno de Microbiología. Pucón, Chile. 04 al 07 de diciembre, 2023.

Blondel, C. Amaya, F. Bustamante, P., Santiviago, C. A. & Pezoa, D. **Identificación de nuevos efectores candidatos antibacterianos de los sistemas de secreción de tipo VI de *Salmonella enterica*.** XLV Congreso Chileno de Microbiología. Pucón, Chile. 04 al 07 de diciembre, 2023.

Santiviago, C. A., **Amaya, F.,** Avilés, A., Sabag, A., Zabner, M., Baisón-Olmo, F. & Álvarez, S. A. **T3SS effector proteins GtgE and SopD2 contribute to intracellular survival of *Salmonella Typhimurium* in *Dictyostelium discoideum*.** ASM Microbe Meeting 2023. Houston, Texas, USA. 15 al 19 de junio, 2023.

Amaya, F., Sabag, A., Zabner, M., Baisón-Olmo, F., Avilés, A., Álvarez, S. A. & Santiviago, C. A. **Participación de los efectores GtgE y SopD2 en la supervivencia intracelular y virulencia de *Salmonella Typhimurium* en la ameba *Dictyostelium discoideum*.** XLIV Congreso Chileno de Microbiología. La Serena, Chile. 29 de noviembre al 02 de diciembre, 2022.

Zabner, M., Baisón-Olmo, F., Avilés, A., **Amaya, F.,** Morgado, C., Ortega, J., Valenzuela, C., Álvarez, S. A. & Santiviago, C. A. **La proteína efectora SopB de *Salmonella Typhimurium* participa en la remodelación de la vía endocítica en *Dictyostelium discoideum*.** XLIV Congreso Chileno de Microbiología. La Serena, Chile. 29 de noviembre al 02 de diciembre, 2022.

Jerez, S., **Amaya, F.** & Blondel, C. **Identificación de un nuevo efector del sistema de secreción del tipo III con dominio putativo bARTT H-Y-E y su contribución a la citotoxicidad de *Vibrio parahaemolyticus* hacia células intestinales humanas.** XLIV Congreso Chileno de Microbiología. La Serena, Chile. 29 de noviembre al 02 de diciembre, 2022.

Blondel, C., **Amaya, F.**, Barros-Infante, M. F., Santiviago, C. A. & Pezoa, D. **Identificación de nuevos efectores antibacterianos del sistema de secreción tipo VI codificado en la isla de patogenicidad SPI-6 de *Salmonella enterica*.** XLIV Congreso Chileno de Microbiología. La Serena, Chile. 29 de noviembre al 02 de diciembre, 2022.

Amaya, F., Sabag, A., Zabner, M., Baisón-Olmo, F., Álvarez, S. A. & Santiviago, C. A. **T3SS effectors GtgE and SopD2 contribute to intracellular survival of *Salmonella* Typhimurium in *Dictyostelium discoideum*.** *FEMS Conference on Microbiology 2022 (Online)*. Belgrado, Serbia. 30 de junio al 02 de julio de 2022.

Amaya, F., Blondel, C. J., Barros-Infante, M. F., Rivera, D., Moreno-Switt, A. I., Santiviago, C. A. & Pezoa, D. **Identification of type VI secretion systems effector proteins that contribute to interbacterial competition in *Salmonella* Dublin.** *FEMS Conference on Microbiology 2022 (Online)*. Belgrado, Serbia. 30 de junio al 02 de julio de 2022.

Amaya, F., Sabag, A., Álvarez, S. A. & Santiviago, C. A. **Los efectores GtgE y SopD2 son requeridos para la supervivencia intracelular de *Salmonella* Typhimurium en la ameba *Dictyostelium discoideum*.** XLIII Congreso Chileno de Microbiología 2021 (*Online*). 30 de noviembre al 02 de diciembre, 2021.

Baisón-Olmo, F., **Amaya, F.**, Zabner, M., Álvarez, S. A. & Santiviago, C. A. **Escrutinio de doble híbrido en levadura para identificar posibles interacciones de los efectores SifA y SopB de *Salmonella* Typhimurium con proteínas de *Dictyostelium discoideum*.** XLIII Congreso Chileno de Microbiología 2021 (*Online*). 30 de noviembre al 02 de diciembre, 2021.

Zabner, M., Morgado, C., Ortega, J, **Amaya, F.**, Valenzuela, C., Álvarez, S. A. & Santiviago, C. A. **Contribución de la proteína efectora SopB de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en el remodelamiento de la vía endocítica en *Dictyostelium discoideum*.** XLIII Congreso Chileno de Microbiología 2021 (*Online*). 30 de noviembre al 02 de diciembre, 2021.

Amaya, F., Sabag, A., Álvarez, S. A. & Santiviago, C. A. **Contribución de los efectores GtgE y SopD2 a la supervivencia intracelular de *Salmonella* Typhimurium en la ameba *Dictyostelium discoideum*.** XXV Congreso de la Asociación Latinoamericana de Microbiología (*Online*). Asunción, Paraguay. 25 al 28 de agosto de 2021.

Pezoa, D., Barros-Infante, M. F., Rivera, D., Moreno-Switt, A. I., **Amaya, F.**, Santiviago, C. A. & Blondel, C. J. **Actividad antibacteriana de los T6SS codificados en las islas SPI-6 y SPI-19 de *Salmonella* Dublin e identificación de proteínas efectoras**

putativas. XXV Congreso de la Asociación Latinoamericana de Microbiología (*Online*). Asunción, Paraguay. 25 al 28 de agosto de 2021.

Zabner, M., Morgado, C., Ortega, J., **Amaya, F.**, Valenzuela, C., Álvarez, S. A. & Santiviago, C. A. **Contribución de la proteína efectora SopB de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en la evasión de la vía de degradación lisosomal en *Dictyostelium discoideum*.** XXV Congreso de la Asociación Latinoamericana de Microbiología (*Online*). Asunción, Paraguay. 25 al 28 de agosto de 2021.

Amaya, F., Sabag, A., Álvarez, S. A. & Santiviago, C. A: **Contribution of T3SS effectors GtgE and SopD2 to the intracellular survival of *Salmonella* Typhimurium in *Dictyostelium Discoideum*.** *World Microbe Forum (Online)*. 20 al 24 de junio, 2021.

17.4.- Participación en actividades académicas y de docencia

Generación de una mutante Δ arnT de *Salmonella* Typhimurium y su contraparte complementada en *trans* para evaluar su sensibilidad a polimixina B. Semestre otoño 2024. Supervisión y entrenamiento experimental de la estudiante de Bioquímica Francisca Vallejos Bustos durante el desarrollo de su unidad de investigación en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Esta actividad curricular fue dirigida por el Dr. Carlos Alberto Santiviago Cid (csantiviago@ciq.uchile.cl), académico del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la misma facultad.

Evaluación de la actividad proteolítica del efector GtgE de *Salmonella* Typhimurium sobre la GTPasa monomérica Rab32A de la ameba *Dictyostelium discoideum* en lisados celulares de cepas recombinantes de *Escherichia coli*. Semestre primavera 2023. Supervisión y entrenamiento experimental de la estudiante de Bioquímica Daniela Ibarra Soto durante el desarrollo de su pasantía de investigación en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Esta actividad curricular fue dirigida por el Dr. Carlos Santiviago (csantiviago@ciq.uchile.cl), académico del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la misma facultad.

Generación de fusiones N- y C-terminal de la proteína efectora SopF al reportero fluorescente GFP mediante clonamiento en los vectores plasmidiales pDM334 y pDM340 para su expresión inducible en la ameba *Dictyostelium discoideum*. Semestre otoño 2023. Supervisión y entrenamiento experimental de la estudiante de Magíster en Bioquímica Carolina Rubilar Leyton durante el desarrollo de su unidad experimental en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Esta actividad curricular fue dirigida por el Dr.

Carlos Santiviago (csantiviago@ciq.uchile.cl), académico del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la misma facultad.

Generación de fusiones N- y C- terminal de la proteína Rab32A al reportero fluorescente GFP mediante clonamiento en los vectores plasmidiales pDM334 y pDM340 para su expresión inducible en la ameba *Dictyostelium discoideum*. Semestre primavera 2022. Supervisión y entrenamiento experimental de la estudiante de Bioquímica Gabriela Osses Serrano durante el desarrollo de su práctica profesional en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Esta actividad curricular fue dirigida por el Dr. Carlos Santiviago (csantiviago@ciq.uchile.cl), académico del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la misma facultad.

Expresión de la proteína Rab32A de *Dictyostelium discoideum* como una fusión C-terminal al reportero fluorescente GFP en una cepa recombinante de *Escherichia coli*. Semestre primavera 2022. Supervisión y entrenamiento experimental de la estudiante de Bioquímica María Jesús Espinoza Córdova durante el desarrollo de su unidad de investigación avanzada en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Esta actividad curricular fue dirigida por el Dr. Carlos Santiviago (csantiviago@ciq.uchile.cl), académico del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la misma facultad.

Evaluación de la distribución subcelular de la proteína de fusión Rab32A-GFP de *Dictyostelium discoideum* mediante microscopía confocal de células vivas en amebas infectadas con distintas cepas bacterianas de *Salmonella Typhimurium*. Semestre otoño 2022. Supervisión y entrenamiento experimental de la estudiante de Magíster en Bioquímica Javiera Pizarro San Martín durante el desarrollo de su unidad experimental en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Esta actividad curricular fue dirigida por el Dr. Carlos Santiviago (csantiviago@ciq.uchile.cl), académico del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la misma facultad.

Inmunodetección mediante *Western blot* de la GTPasa Rab32A de *Dictyostelium discoideum* en un linaje transformante de la ameba que expresa ectópicamente la proteína como una fusión C-terminal al reportero GFP. Semestre otoño 2022. Supervisión y entrenamiento experimental de la estudiante de Bioquímica Carolina Calquín Bahamondes durante el desarrollo de su unidad de investigación en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Esta actividad curricular fue dirigida por el Dr. Carlos Santiviago (csantiviago@ciq.uchile.cl), académico del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la misma facultad.

Generación de las cepas complementadas en *trans* para las mutantes Δ gtgE, Δ sopD2 y Δ gtgE Δ sopD2 de *Salmonella Typhimurium* 14028s. Semestre primavera 2021. Supervisión y entrenamiento experimental de la estudiante de Bioquímica Javiera Pizarro San Martín durante el desarrollo de su práctica profesional en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Esta actividad curricular fue dirigida por el Dr. Carlos Santiviago (csantiviago@ciq.uchile.cl), académico del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la misma facultad.

Generación de una cepa de *Dictyostelium discoideum* que expresa la proteína de fusión Rab32A-GFP a partir de un plasmidio recombinante. Semestre primavera 2021. Supervisión y entrenamiento experimental de la estudiante de Bioquímica Carolina Rubilar Leyton durante el desarrollo de su práctica profesional en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Esta actividad curricular fue dirigida por el Dr. Carlos Santiviago (csantiviago@ciq.uchile.cl), académico del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la misma facultad.

Microbiología. Ayudante semestre otoño (2019 – 2022). Curso teórico-práctico de Microbiología dirigido a estudiantes de la carrera de Química y Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. La coordinación académica estuvo a cargo del Dr. Carlos Santiviago (csantiviago@ciq.uchile.cl) y el Dr. Sergio Álvarez (salvarez@uchile.cl) del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular perteneciente a la misma facultad.

Microbiología General. Ayudante semestre otoño (2019 – 2022). Curso teórico-práctico de Microbiología dirigido a estudiantes de la carrera de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. La coordinación académica estuvo a cargo del Dr. Carlos Santiviago (csantiviago@ciq.uchile.cl) y el Dr. Sergio Álvarez (salvarez@uchile.cl) del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular perteneciente a la misma facultad.

Fisiología y Genética Microbiana. Ayudante semestre primavera (2019 – 2023). Curso teórico-práctico dirigido a estudiantes de la carrera de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. La coordinación académica estuvo a cargo del Dr. Carlos Santiviago (csantiviago@ciq.uchile.cl) y el Dr. Sergio Álvarez (salvarez@uchile.cl) del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular perteneciente a la misma facultad.

17.5.- Participación en actividades de extensión y vinculación con el medio

Plan Colegios 2023. Participación como monitor en múltiples visitas de delegaciones escolares al Laboratorio de Microbiología (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular), las cuales fueron coordinadas por Edgardo Zúñiga Droguett (ezuniga@uchile.cl) en el marco del programa "Plan Colegios", una iniciativa desarrollada por la Unidad de Vinculación e Integración con el Medio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Actividad Científica Colegio Villa Maria Academy 2023. Octubre 2023. Sesión de análisis y discusión sobre los resultados de experimentos microbiológicos realizados por estudiantes de sexto año básico del Colegio *Villa Maria Academy*. En la instancia se participó junto al Dr. Sergio Álvarez (salvarez@uchile.cl). Además, se asistió a la presentación de paneles científicos elaborados por estudiantes de distintos niveles de enseñanza.

Charla Científica Colegio Bicentenario Madre Ana Eugenia 2023. Octubre 2023. Charla sobre la experiencia y trayectoria personal durante la formación académica y desempeño como un científico. La Charla, titulada "Cómo ser un/a científico/a desde la experiencia de un microbiólogo", se dictó a estudiantes del Colegio Bicentenario Madre Ana Eugenia 2023 en el contexto de una feria científica escolar organizada por el Prof. Guillermo Vidal (gvidal@colegiomae.cl). Al evento se acudió en representación del Dr. Carlos Santiviago (csantiviago@ciq.uchile.cl).

Ciencia Pública en Verano 2023. Febrero 2023. Iniciativa de difusión científica organizada por el Ministerio de Ciencia, Tecnología, Conocimiento e Innovación, en la cual se desarrollaron talleres de experimentación destinados para niños y niñas de las localidades de Quillón en la Región de Ñuble y de Tomé y Santa Juana en la Región del Biobío. En esta actividad se desempeñó el rol de monitor científico como parte del equipo humano dirigido por Jaime Lepe Órdenes (jlepe@minciencia.gob.cl).

Charla Científica Colegio Villa Maria Academy 2022. Octubre 2022. Charla sobre el desempeño del profesional Bioquímico(a) en la ciencia y su quehacer investigativo en Microbiología. La charla se dictó junto al Dr. Sergio Álvarez (salvarez@uchile.cl) a estudiantes de tercer año de enseñanza media del Colegio *Villa Maria Academy*. Adicionalmente, se realizó una sesión de conversación con estudiantes de cuarto medio y se participó en la presentación de paneles científicos elaborados por estudiantes de distintos niveles de enseñanza media.