Universidad Andrés Bello

Facultad de Ciencias de la Vida

“Efecto de la alta osmolaridad en la entrega de factores de virulencia a células epiteliales por OMVs (*Outer Membrane Vesicles*) de *Salmonella enterica* serovar Typhi”

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Magíster en Biotecnología y Ciencias de la Vida.

Ignacio Andrés Fuentes Cáceres

Tutor: Dr. Juan Fuentes Aravena

Enero, 2023

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN 6
ABSTRACT 8
2. INTRODUCCIÓN 10
Salmonella enterica serovar Typhi. 10
SipB y SipC: Efectores importantes para la infección de *Salmonella*. 10
Vesículas de membrana externa (OMVs). 11
OMVs de *S.* Typhi. 12
Efecto de la alta osmolaridad como condición intestinal en OMVs de *S.* Typhi. 13
Diferencias entre *S.* Typhi y *S.* Typhimurium 14
Novedad e impacto del trabajo 15
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 18
4.1. Material biológico. 19
4.2. Cepa bacteriana y condiciones de cultivo. 19
4.3. Cultivo celular y condiciones de cultivo. 19
4.4. Caracterización de OMVs. 20
4.5. Mutagénesis por *Red-Swap*. 21
4.6. Comprobación de cepas mutantes. 23
4.7. Detección de efectores en OMVs. 24
4.8. Cinética de internalización de OMVs. 25
4.9. Entrega de efectores a células epiteliales a través de OMVs. 26
5. RESULTADOS 29
5.1. La alta osmolaridad promueve la producción de OMVs. 29
5.2. La alta osmolaridad modula el cargamento de proteínas en OMVs de *S.* Typhi. 30
5.3. Detección de efectores en OMVs: Construcción de mutantes. 31
5.4. Detección de efectores en OMVs: Chequeo construcción de mutantes. 32
5.5. Detección de efectores en OMVs: Secuenciación de mutantes. 33
5.6. Producción de OMVs mutantes *sipB*-3×FLAG y *sipC*-3×FLAG 39
5.7. Perfil de proteínas en OMVs de mutantes *sipB*-3×FLAG y *sipC*-3×FLAG 40
5.8. La alta osmolaridad aumenta la carga de SipC en OMVs de *S.* Typhi. 41
5.9. La alta osmolaridad favorece la internalización de OMVs de *S.* Typhi. 45
5.10. Detección de efectores en bacterias en condiciones no desnaturantes. 47
5.11. La alta osmolaridad favorece la entrega de SipC a través de OMVs de *S.* Typhi. 49
5.12. Construcción de fusiones reporteras con *bla*. 55
5.13. Construcción de fusiones reporteras con *bla*: Secuenciación. 59

5.14. Ensayo de actividad β-lactamasa como reportero. 61
6. DISCUSIÓN 63
7. CONCLUSIONES 71
8. ANEXO 72
9. REFERENCIAS 83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Antecedentes experimentales 16
Figura 2. La alta osmolaridad promueve la producción de OMVs 30
Figura 3. La alta osmolaridad modula el cargamento de proteínas de OMVs de *S.* Typhi. . 31
Figura 4. Esquema de construcción de mutantes 32
Figura 5. Construcción de mutantes *sipB* y *sipC* etiquetadas con el epítopo 3x-FLAG. 33
Figura 6. Esquema obtenido luego de la secuenciación de las mutantes *sipB*-3×FLAG y *sipC*-3×FLAG 35
Figura 7. Alineamiento múltiple mutante *sipB*-3×FLAG (página anterior). 37
Figura 8. Alineamiento múltiple mutante *sipC*-3×FLAG (página anterior). 39
Figura 9. Producción de OMVs en mutantes etiquetadas con el epítopo 3×FLAG. 40
Figura 10. Perfil de proteínas mutantes etiquetadas con el epítopo 3×FLAG. 41
Figura 11. Inmunodetección de SipB y SipC por *Western Blot* (página anterior) 43
Figura 12. La alta osmolaridad aumenta la carga de SipC en OMVs de *S.* Typhi. 44
Figura 13. La alta osmolaridad favorece la internalización de OMVs de *S.* Typhi. 46
Figura 14. Detección de efectores en bacterias en condiciones no desnaturantes (página anterior). 49
Figura 15. La alta osmolaridad favorece la entrega de SipC a través de OMVs de *S.* Typhi (controles inmunofluorescencia) 51
Figura 16. La alta osmolaridad favorece la entrega de SipC a través de OMVs de *S.* Typhi (OMVs NaCl 300 mM) 52
Figura 17. La alta osmolaridad favorece la entrega de SipC a través de OMVs de *S.* Typhi (OMVs LB) 53
Figura 18. SipC entregado por OMVs se encuentra en la periferia celular. 54
Figura 19. Representación de plásmidos con fusiones genéticas con *bla*. 57
Figura 20. *Screening* construcción de plásmidos con fusiones con *bla* 58
Figura 21. Comprobación fusiones con *bla* y clonación 59
Figura 22. Alineamiento de regiones críticas de fusiones con *bla* (página anterior). 61
Figura 23. Ensayo de actividad β-lactamasa como reportero 62
Figura 24. La fusión del péptido señal de OmpA permite la carga y entrega de mCherry por OMVs a células en cultivo 70
Figura 25. La alta osmolaridad aumenta la carga de SipC en OMVs de *S.* Typhi (Anticuerpo secundario conjugado con HRP) 78
Figura 26. Esquema de construcción de mutantes Δ*invA* y Δ*sipBC*. 80
Figura 27. Construcción de mutantes Δ*invA* y Δ*sipBC* 81
Figura 28. Ensayo de protección a gentamicina y ensayo de complementación 82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Antecedentes proteómicos de OMVs de *S.* Typhi 17
Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo. 72
Tabla 3. Partidores utilizados en este trabajo. 74
Tabla 4. Cepas utilizadas en este trabajo. 77

AGRADECIMIENTOS

Tesis financiada por FONDECYT REGULAR 1220584

1. RESUMEN

Salmonella enterica serovar Typhi (*S.* Typhi) es un patógeno Gram negativo intracelular estricto de humanos y es el agente etiológico de la fiebre tifoidea. La invasión de *Salmonella* en células intestinales está mediada por el Sistema de Secreción de Tipo III (TTSSIII) y su expresión es regulada por señales ambientales presentes en el intestino, como la alta osmolaridad. La alta osmolaridad promueve la expresión de proteínas asociadas al TTSSIII, como SipB y SipC, que conforman el translocón del TTSSIII. El translocón se inserta en la membrana de la célula hospedera y forma un poro para permitir la inyección de proteínas que favorecen la internalización de *S.* Typhi. Existe evidencia genética que indica que SipB y SipC son secretados por el inyectisoma hacia el medio extracelular, y de esta manera llegan a la membrana de la célula hospedera para formar el translocón del TTSSIII, sin embargo, creemos que pueden existir mecanismos alternativos de entrega de estos factores de virulencia.

Las vesículas de membrana externa (OMVs, del inglés *Outer Membrane Vesicles*) son proteoliposomas con estructuras heterogéneas del orden de los 20 a 200 nm, liberadas desde la membrana externa de bacterias Gram negativo. Las OMVs son capaces de transportar biomoléculas y destacan por su capacidad de **entrega de factores de virulencia.** Además, se ha reportado que las propiedades y el cargamento de OMVs pueden ser modificadas según las **condiciones de cultivo.** Experimentos preliminares indican que las OMVs provenientes de bacterias de *S.* Typhi en condiciones intestinales son capaces de ser internalizadas a mayor tasa y en un mayor porcentaje de células en cultivo, en comparación con OMVs provenientes de *S.* Typhi en condiciones estándar, sugiriendo un cambio en las propiedades de las OMVs dado por las condiciones de cultivo. Hipotetizamos que la alta osmolaridad cambia propiedades de OMVs de *S.* Typhi, favorece la internalización OMVs y

entrega de factores de virulencia en células epiteliales a través de OMVs. Se compararon OMVs obtenidas desde condiciones de cultivo estándar y condiciones de cultivo con alta osmolaridad. El perfil proteico de OMVs se estudió por SDS-PAGE. La presencia de factores de virulencia en las OMVs se determinó por *Western Blot.* La internalización de OMVs se analizó por citometría de flujo y la entrega de factores de virulencia a células epiteliales se determinó por inmunocitoquímica. También estudiamos entrega de factores de virulencia utilizando actividad β-lactamasa como reportero. Encontramos que la alta osmolaridad modula el cargamento de proteínas en OMVs de *S.* Typhi. La alta osmolaridad aumenta la carga de SipC en OMVs de *S.* Typhi. Además, la alta osmolaridad favorece la internalización de OMVs en células epiteliales y también favorece la entrega de SipC a células epiteliales mediante OMVs. Como conclusión, encontramos que la alta osmolaridad cambia el perfil de proteínas OMVs, aumenta la carga de factores de virulencia y entrega de estos en células epiteliales a través de OMVs. Estos hallazgos pueden ayudar a dilucidar la potencial participación de OMVs de *S.* Typhi en su ciclo infectivo.

ABSTRACT

Salmonella enterica serovar Typhi (*S.* Typhi) is a strict intracellular Gram-negative pathogen of humans and is the etiological agent of typhoid fever. The invasion of *Salmonella* into intestinal cells is mediated by the Type III Secretion System (TTSSIII), and its expression is regulated by environmental signals present in the intestine, such as high osmolarity. High osmolarity promotes the expression of TTSSIII-associated proteins, such as SipB and SipC, which make up the TTSSIII translocon. The translocon inserts into the host cell membrane and forms a pore to allow the injection of proteins that promote *S.* Typhi's internalization. Genetic evidence shows that the injectisome secretes SipB and SipC into the extracellular milieu before reaching the host cell membrane to form the TTSSIII translocon; however, we believe that there may be alternative delivery mechanisms for these virulence factors.

Outer membrane vesicles (OMVs) are proteoliposomes with heterogeneous structures of 20 to 200 nm, released from the outer membrane of Gram-negative bacteria. OMVs can transport biomolecules and are noted for their ability to deliver virulence factors. In addition, it has been reported that the OMV properties and cargo can be modified depending on the culture conditions. Preliminary experiments indicate that OMVs from *S.* Typhi bacteria under intestinal conditions can be internalized at a higher rate and in a higher percentage of cells in culture compared to OMVs from *S.* Typhi under standard conditions, suggesting a change in OMV properties given by culture conditions. We hypothesized that high osmolarity changes the properties of OMVs from *S.* Typhi, favoring OMV internalization and delivery of virulence factors into epithelial cells through OMVs. OMVs obtained from standard culture conditions, and high osmolarity culture conditions were compared. The protein profile of OMVs was studied by SDS-PAGE. The presence of virulence factors in OMVs was determined by western blot. Internalization of OMVs was analyzed by flow cytometry, and

delivery of virulence factors to epithelial cells was determined by immunocytochemistry. We also studied virulence factor delivery using β-lactamase activity as a reporter. We found that high osmolarity modulates protein loading in *S.* Typhi OMVs. In addition, high osmolarity increases SipC loading in *S.* Typhi OMVs. Furthermore, high osmolarity favors the internalization of OMVs into epithelial cells and also favors the delivery of SipC to epithelial cells by OMVs. In conclusion, we found that high osmolarity changes the OMVs protein profile and increases virulence factor loading and delivery of virulence factors into epithelial cells via OMVs. These findings may help to elucidate the potential involvement of OMVs of S. Typhi in its infectious cycle.

2. INTRODUCCIÓN

***Salmonella enterica* serovar Typhi.**

Salmonella enterica serovar Typhi (*S.* Typhi) es un patógeno intracelular estricto de humanos y es el agente etiológico de la fiebre tifoidea (Kaur & Jain, 2012). *S.* Typhi es un patógeno Gram negativo capaz de invadir células intestinales. La adhesión y posterior invasión en células intestinales está mediada por el Sistema de Secreción de Tipo III (TTSSIII) (Ramos-Morales, 2012). El TTSSIII también conocido como inyectisoma, se encuentra codificado en la Isla de Patogenicidad I de *Salmonella*, y es un complejo de proteínas con forma de aguja que se ensambla en la membrana celular de la bacteria y que está encargado de la translocación de proteínas efectoras hacia el citoplasma de la célula hospedera (Lou, Zhang, Piao, & Wang, 2019; Phoebe Lostroh & Lee, 2001). Las proteínas efectoras, de manera general, modulan algunas funciones celulares y favorecen la entrada de *S.* Typhi hacia la célula hospedera, por ejemplo, produciendo rearreglos de actina que favorecerán la invasión de *S.* Typhi en la célula hospedera a través de vacuolas (Kaur & Jain, 2012; Lou et al., 2019). En *S.* Typhi, la expresión de las proteínas efectoras es promovida por **condiciones intestinales, como microaerofilia, presencia de bilis y alta osmolaridad**. Entre las proteínas efectoras que ven favorecida su expresión en condiciones intestinales se encuentra SipB y SipC (Johnson, Ravenhall, et al., 2018; Lou et al., 2019).

SipB y SipC: Efectores importantes para la infección de *Salmonella*.

Las proteínas SipB y SipC forman el translocón del TTSSIII, el cual es un componente esencial para lograr la translocación de proteínas efectoras. SipB y SipC, se insertan en la membrana de la célula hospedera a través de sus dominios hidrofóbicos y forman un poro para permitir el paso de las proteínas efectoras hacia el citoplasma de la célula intestinal (Hayward & Koronakis, 1999; Myeni, Wang, & Zhou, 2013). De este modo,

el TTSSIII se conecta con el translocón a través de la proteína SipD que está en la punta del inyectisoma, la bacteria se adhiere con la célula hospedera y se efectúa la translocación o "inyección" de las proteínas efectoras (Lara-Tejero & Galán, 2009). Destacando el rol del translocón en la invasión mediada por el TTSSIII, se ha reportado que cepas mutantes de *S. enterica* Δ*sipB* o Δ*sipC* no muestran capacidad de invasión en células epiteliales (Kaniga, Tucker, Trollinger, & Galán, 1995). Existe evidencia genética que indica que SipB y SipC son secretados por el inyectisoma hacia el medio extracelular, y de esta manera llegan a la membrana de la célula hospedera para formar el translocón del TTSSIII (Kubori, Sukhan, Aizawa, & Galán, 2000); sin embargo, creemos que pueden existir mecanismos alternativos de entrega de efectores de *Salmonella* Typhi (Bonnington & Kuehn, 2014; Rueter & Bielaszewska, 2020).

Vesículas de membrana externa (OMVs).

Las vesículas de membrana externa (OMVs, del inglés *Outer-Membrane Vesicles*) son proteoliposomas con estructuras heterogéneas esféricas del orden de los 20 a 200 nm, liberadas desde la membrana externa de bacterias Gram negativo en un proceso que no involucra lisis celular ni muerte (Schwechheimer & Kuehn, 2015). En general, la liberación de OMVs constituye una respuesta frente a estrés, por ejemplo, factores ambientales como la exposición frente a antibióticos promueve la producción de OMVs (Schwechheimer & Kuehn, 2015). Sin embargo, factores ambientales presentes en el ciclo infectivo de las bacterias también podrían considerarse como agentes estresores que pueden afectar la vesiculación (Taheri et al., 2018). Las OMVs contienen fosfolípidos, lipopolisacáridos (LPS), proteínas, DNA y RNA (Toyofuku, Nomura, & Eberl, 2019). Las OMVs poseen diversas funciones, destacando entre ellas la **capacidad de entrega de factores de virulencia** a células eucariontes. Por ejemplo, OMVs de *Escherichia coli* enterohemorrágica

cargan y entregan la toxina Shiga en células epiteliales (Bielaszewska et al., 2017). Por otra parte, algunas **propiedades de las OMV pueden ser modificadas** dependiendo de las **condiciones en las que se cultiva la bacteria** (Orench-Rivera & Kuehn, 2016). Algunas de las propiedades que pueden ser modificadas son el tamaño de la OMV y el cargamento de proteínas. En relación al tamaño de OMVs, se ha descrito que OMVs de *S.* Typhimurium obtenidas desde bacterias crecidas en medio con pH ácido poseen un tamaño medio mayor en comparación a OMVs obtenidas desde bacterias crecidas en un medio de cultivo estándar (Bonnington Katherine & Kuehn Meta, 2016). Respecto el cargamento de proteínas, se ha reportado que OMVs de *S.* Typhimurium obtenidas desde bacterias crecidas en medio mínimo ácido cambian su cargamento de proteínas respecto OMVs obtenidas desde condiciones estándar de laboratorio. Además, dentro de las proteínas que se cargan en OMVs de *S.* Typhimurium en medio mínimo ácido, se encuentran proteínas asociadas con supervivencia en macrófagos (Bai, Kim, Ryu, & Yoon, 2014), lo que sugiere que las OMVs pueden participar en procesos biológicos de la bacteria.

OMVs de *S.* Typhi.

En nuestro laboratorio demostramos que las OMVs de *S.* Typhi son capaces de ser internalizadas en células epiteliales (Parra, 2019). Experimentos **preliminares** indican que las OMVs provenientes de bacterias de *S.* Typhi en condiciones intestinales (microaerofilia y alta osmolaridad) son capaces de ser **internalizadas a mayor tasa y en un mayor porcentaje de células en cultivo**, en comparación con OMVs provenientes de *S.* Typhi en condiciones de laboratorio, sugiriendo un cambio en las propiedades de las OMVs dado por las condiciones intestinales (Figura 1). Por otra parte, en nuestro laboratorio realizamos análisis proteómicos de OMVs provenientes de *S.* Typhi en condiciones de laboratorio. Como resultado, encontramos que **las OMVs de *S.* Typhi cargan factores de virulencia, entre**

ellos SipB y SipC, que conforman el translocón del TTSSIII (Tabla 1). Este hallazgo sugiere que las proteínas SipB y SipC pueden ser entregadas en células eucariontes a través de OMVs.

Efecto de la alta osmolaridad como condición intestinal en OMVs de *S.* Typhi.

En nuestro laboratorio experimentalmente definimos las condiciones intestinales para este estudio. Dentro de las variables se encontraba la microaerofilia, presencia de bilis y alta osmolaridad. Descartamos la microaerofilia y la bilis ya que, en el caso de la microaerofilia la producción de OMVs resultó ser muy baja, lo que limita el trabajo y por otra parte la bilis posee pigmentación y precipitados, lo que ensucia la muestra y perturba el trabajo (datos no mostrados). De esta manera, y como principal motivo seleccionamos la condición de alta osmolaridad con la concentración de 300 mM NaCl porque es una de las condiciones ambientales más importantes en la estimulación de la expresión de favores de virulencia asociados al TTSSIII (Johnson, Mylona, & Frankel, 2018). Particularmente, la concentración de 300 mM NaCl es similar a la presente en el intestino (Pickard et al., 1994) y promueve la sobreexpresión de los genes presentes en la Isla de Patogenicidad I, entre ellos *sipB* y *sipC* que son claves para invasión en células intestinales (Arricau et al., 1998; Lou et al., 2019). De esta manera, hasta este punto sabemos que la alta osmolaridad forma parte del contexto biológico en el ciclo de vida de *Salmonella* y: 1) Funciona como un estímulo ambiental que promueve un **aumento en la expresión de proteínas efectoras** y 2) **Las condiciones de cultivo bacteriano pueden modificar algunas propiedades de las OMVs**, como por ejemplo el cargamento de proteínas (Orench-Rivera & Kuehn, 2016). Sin embargo, se desconoce el efecto de la alta osmolaridad como contexto biológico sobre OMVs de *S.* Typhi. Al respecto, podemos especular que la alta osmolaridad como estímulo ambiental, podría considerarse un agente estresor que promueve la producción de OMVs, y que OMVs

obtenidas desde condición con alta osmolaridad tienen modulado su cargamento de proteínas, incorporando proteínas que no están en condiciones estándar de laboratorio y/o **aumentando la carga de proteínas asociadas a virulencia, por ejemplo de SipB y SipC**. También podemos esperar que exista un **aumento en la internalización de OMVs y entrega de proteínas a través de OMVs** en células eucariontes. Por estas razones, considerando el análisis proteómico de OMVs de *S.* Typhi y lo descrito en la literatura, creemos que OMVs provenientes de bacterias de *S.* Typhi crecidas en condiciones de alta osmolaridad presenten SipB y SipC en mayores cantidades respecto OMVs de bacterias crecidas en condiciones de laboratorio estándar y que OMVs obtenidas desde condiciones con alta osmolaridad entreguen SipB y SipC en mayores cantidades a células epiteliales. Así, en el presente proyecto hipotetizamos que la alta osmolaridad cambia propiedades de OMVs de *S.* Typhi, favorece la internalización OMVs y entrega de factores de virulencia en células epiteliales a través de OMVs.

Se ha reportado que SipB y SipC son cargadas en OMVs de *S.* Typhimurium. Además, OMVs de *S.* Typhimurium entregan SipC a células epiteliales. (Kim, Kim, Kim, Hwang, & Yoon, 2018). Sin embargo, los investigadores no se refieren al rol de la **alta osmolaridad como contexto biológico** en la producción de OMVs, las propiedades de OMVs provenientes de una condición de cultivo con alta osmolaridad, el efecto de la alta osmolaridad sobre la internalización de OMVs y entrega de efectores a través de OMVs en células eucariontes, lo que diferencia lo reportado de nuestro trabajo.

Diferencias entre *S.* Typhi y *S.* Typhimurium

En relación con lo anterior, *S.* Typhi y *S.* Typhimurium son serovares similares. Sin embargo, tienen importantes diferencias. La principal y diferencia crítica entre estos serovares es que *S.* Typhi es un patógeno estricto de humanos y produce una enfermedad

sistémica grave potencialmente mortal; *S.* Typhimurium, por el contrario, infecta una amplia gama de hospederos y produce sólo gastroenteritidis autolimitada en humanos (Johnson, Ravenhall, et al., 2018). Desde un punto de vista genómico, *S.* Typhi y *S.* Typhimurium comparten un 89% de sus genes. Además, aunque ambos serovares comparten factores de virulencia como SipB y SipC, *S.* Typhi posee destacables factores de virulencia como HlyE y la toxina tifoidea, mientras que *S.* Typhimurium posee otros factores de virulencia como SopA, SopE2, SopD2, entre otros (Johnson, Mylona, et al., 2018; Sabbagh, Forest, Lepage, Leclerc, & Daigle, 2010). Así, también existen **diferencias entre las OMVs de *S.* Typhi y *S.* Typhimurium**. Por ejemplo, existen diferencias en los genes asociados a la biogénesis de OMVs de *S.* Typhi y *S.* Typhimurium (Nevermann et al., 2019). Presumiblemente también existen diferencias en sus composiciones (McBroom & Kuehn, 2007), destacando muchas otras potenciales diferencias. Por estas razones, datos obtenidos en *S.* Typhimurium no se deben extrapolar directamente a *S.* Typhi sin aproximación experimental (Urrutia et al., 2014). Y aunque estudios sobre *S.* Typhimurium han sido fundamentales para entender la virulencia en *Salmonella*, **prácticamente no se sabe nada sobre el rol de las OMVs de *S.* Typhi en su patogénesis**.

Novedad e impacto del trabajo

Si bien se ha reportado las OMVs de *S.* Typhimurium son capaces de entregar proteínas efectoras en células epiteliales (Kim et al., 2018), nada de esto se sabe en *S.* Typhi. Aunque es posible que el fenómeno de entrega de efectores a través de OMVs en células eucariontes sea similar en *S.* Typhi, no se puede extrapolar directamente sin aproximación experimental y nuestro trabajo se diferencia de lo reportado en *S.* Typhimurium porque nos interesa estudiar esto en un contexto biológico. Por este motivo, estudiamos la alta osmolaridad como contexto biológico y una señal ambiental que modifica propiedades de

OMVs, destacando entre ellas, la característica de favorecer la internalización de OMVs y también aumentar la entrega de efectores en células eucariontes. Así, este trabajo ayudará entender de mejor manera la patogénesis de *S.* Typhi y **dilucidar la potencial participación de OMVs en la patogénesis de *S.* Typhi**.

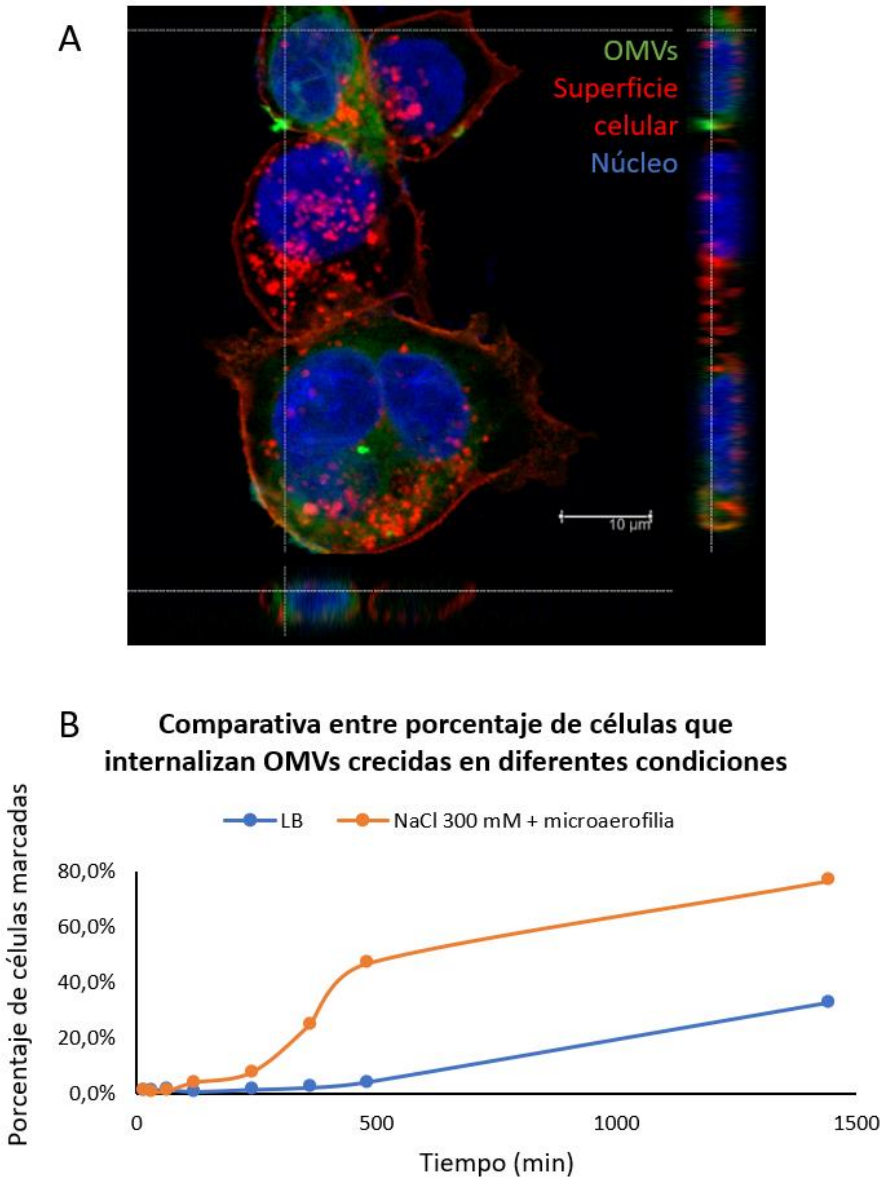


Figura 1. Antecedentes experimentales. A. Internalización de OMVs. Microscopía confocal de OMVs de *S.* Typhi provenientes de condiciones de laboratorio incubadas en células HT-29 durante 180 min. Con DiO, WGA y Hoechst se tiñeron OMVs, la superficie celular y núcleo, respectivamente (Parra, 2021). **B.** Comparativa de internalización de OMVs provenientes de condiciones de cultivo estándar (LB) y NaCl 300 mM + microaerofilia durante 1440 min (24 horas) en células HT-29. La internalización se determinó por citometría de flujo, donde se tiñeron OMVs con DiO.

Tabla 1. Antecedentes proteómicos de OMVs de *S.* Typhi. Proteínas efectoras de la Isla de Patogenicidad 1 de *Salmonella* asociadas a TTSSIII encontradas en OMVs de *S.* Typhi provenientes de condiciones estándar de laboratorio mediante análisis proteómico (n = 3). Con un cuadro rojo se señalan las proteínas SipB y SipC conformadoras del translocón del TTSSIII.

Proteínas efectoras	**Proteínas presentes en OMVs de *S.* Typhi**
SipA	+
SipB	+
SipC	+
SopB	+
SopE	+

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La alta osmolaridad cambia propiedades de OMVs de *S.* Typhi, favorece la internalización OMVs y entrega de factores de virulencia en células epiteliales a través de OMVs.

Objetivo general

Comparar las propiedades, internalización en células epiteliales en cultivo y la entrega de factores de virulencia de OMVs de *S.* Typhi obtenidas a partir de cultivos con alta osmolaridad y condiciones estándar de cultivo.

Objetivos específicos

A) Caracterizar OMVs de *S.* Typhi provenientes de una condición de cultivo con alta osmolaridad.

B) Comparar la internalización de OMVs de *S.* Typhi provenientes de una condición de cultivo con alta osmolaridad respecto OMVs provenientes condiciones de cultivo estándar.

C) Comparar la entrega de factores de virulencia en células epiteliales a través de OMVs de *S.* Typhi en condiciones de cultivo con alta osmolaridad, respecto condiciones de cultivo estándar.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material biológico.

4.1.1. Vectores, partidores y cepas utilizadas en este trabajo. Los plásmidos utilizados en este trabajo corresponden a los presentes en la Tabla 2. Los partidores utilizados se ven representados en la Tabla 3. Las cepas bacterianas construidas y utilizadas en este trabajo se indican en la Tabla 4. Las Tablas 2, 3 y 4 se encuentran adjuntas en anexo.

4.2. Cepa bacteriana y condiciones de cultivo.

Se utilizó la bacteria *Salmonella enterica* serovar Typhi (STH2370) (Valenzuela et al., 2014) y *Escherichia coli* DH5α para almacenar plásmidos.

En este trabajo se utilizaron dos tipos de caldo para cultivo líquido: El medio de cultivo estándar de laboratorio se realizó en caldo Luria-Bertani (LB, 86 mM NaCl) (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 5 g/L) y medio LB con alta osmolaridad (NaCl 300 mM) que contenía (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 17,5 g/L). Los cultivos se realizaron en forma aeróbica con agitación a 37 °C. Los cultivos sólidos se realizaron adicionando agar-agar (15 g/L) en los caldos LB líquidos. Cepas resistentes a antibióticos se crecieron en medio LB o LB NaCl 300 mM a las siguientes concentraciones de antibióticos: ampicilina (Amp) 100 μg/mL, kanamicina (Kan) 50 μg/mL y cloranfenicol (Cam) 20 μg/m.

4.3. Cultivo celular y condiciones de cultivo.

Las células de la línea celular HT-29 (ECACC, *European Collection of Authenticated Cell Cultures*) (adenocarcinoma colorrectal humano) fueron crecidas en botellas con superficie de 25 cm^2 durante su cultivo rutinario y traspasadas a botellas de 75 cm^2 previo a realizar los experimentos. Las células se cultivaron en medio *Dulbecco´s High Glucose Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco™; 4,5 g/L D-glucosa, L-Glutamina y 110 mg/L de piruvato de

sodio), suplementado al 10% v/v con suero fetal bovino (SFB) y 0.5% de penicilina-estreptomicina (pen/strep) (HyClone™). Las células fueron incubadas a 37 °C y con 5% de CO_2. Se les realizó cambio de medio cada 3-4 días y se subcultivaron una vez a la semana con tripsina-EDTA (0,25%, 0,53 mM) (Gibco™).

4.4. Caracterización de OMVs.

4.4.1. Purificación de OMVs. Las OMVs se purificaron según el protocolo descrito en (Nevermann et al., 2019) con algunas modificaciones. De un cultivo en fase estacionaria en medio LB o LB con alta osmolaridad se obtuvo el sobrenadante a través de centrifugación (10 min, 5.400 ×*g*, 4 °C), se descartó el *pellet* y filtró el sobrenadante (0,45 μm, *millipore*). El sobrenadante pasó por el proceso de ultrafiltración (Amicon Bioseparación) con discos ultrafiltración de 100 KDa (Ultracell®). Las OMVs en el filtrado se precipitaron por centrifugación (3 hrs, 150.000×*g*, 4 °C), se resuspendió el *pellet* en *buffer* fosfato salino Dulbecco's 1× (DPBS) y se filtró nuevamente (0,45 μm, *millipore*). Para comprobar que las OMVs estaban libres de bacterias se plaquearon 5 μL en placas agar LB. Las OMVs purificadas de guardaron a -20 °C hasta su uso. La concentración de proteínas se determinó utilizando Pierce™ BCA *protein Assay Kit* y la cantidad de lípidos usando la sonda FM4-64, tal como se reportó previamente (Nevermann et al., 2019).

4.6.2. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE. La electroforesis de proteínas en SDS-PAGE se realizó como se describe en (Sidhu, Vorhölter, Niehaus, & Watt, 2008) con algunas modificaciones. En cada pocillo se cargaron 30 μg de OMVs cuantificadas por proteínas, previamente mezcladas con solución buffer de carga (Tris-HCl 187,5 mM pH 6,8; SDS 6%, glicerol 30%, azul de bromofenol 0,03%; β-mercaptoetanol 15%), y posteriormente calentadas a 98 ºC por 5 min. La electroforesis se realizó a 50 V constantes hasta que las muestras atravesaran el gel concentrador. Luego se aumentó a 100 V constantes hasta que el

frente de migración atravesara el gen separador. Finalmente, las proteínas fueron detectadas utilizando One-Step Blue (Biotium).

4.5. Mutagénesis por *Red-Swap*.

4.5.1. Ensayos de reacción de polimerasa en cadena. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador BioRad usando DNA polimerasa *Taq* DNA Polymerase *Recombinant* (Invitrogen) en un volumen estándar de 25 µL. Las mezclas de reacción contenían: *buffer* de reacción 10×, 50 mM MgCl2, 10 mM dNTPs mix, partidor *forward* 10 µM, partidor *reverse* 10 µM, 100 ng de DNA, 2 U de *Taq* DNA Polymerase y finalmente agua sin nucleasas para completar el volumen de reacción. Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de denaturación a 94 ºC por 3 min. 30 ciclos que incluyeron: denaturación a 94 ºC por 45 seg., hibridación a 55 ºC por 30 seg. y extensión a 72 ºC, cuyo tiempo depende del tamaño del fragmento a amplificar (1,5 min. por kilobase). Finalmente, un período de extensión final a 72 ºC por 10 min. Para la amplificación de productos de PCR destinados a mutagénesis por *Red-Swap* en lugar de utilizar un volumen de reacción de 25 µL, se utilizó un volumen de reacción de 100 µL y como templado se usaron los plásmidos pKD4 o pSUB11. Para esto se modificó el programa de PCR convencional: 1 ciclo de denaturación a 94 ºC por 3 min. 35 ciclos que incluyeron: denaturación a 94 ºC por 45 seg., hibridación a 55 ºC por 30 seg. y extensión a 72 ºC, por 2,5 min. Finalmente, un período de extensión final a 72 ºC por 10 min.

4.5.2. Electroforesis de DNA. Los geles se prepararon utilizando agarosa a una concentración final de 1% en *buffer* TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8.0; EDTA 1 mM) y 0.01 % de SYBR Safe (Invitrogen). Las muestras de DNA a analizar se mezclaron con el volumen correspondiente de *buffer* 6× TriTrack DNA Loading Dye (Invitrogen) antes de ser cargadas en el gel. Los ensayos de electroforesis se realizaron a voltaje de 100 V constantes. Las bandas de DNA se visualizaron y se fotografiaron sobre un transiluminador UV.

4.5.3. Purificación de bandas de interés. Las bandas de interés se purificaron usando E.Z.N.A. *Gel Extraction Kit* (Omega Bio-Tek) según el protocolo del fabricante.

4.5.4. Cepas receptoras y transformación con producto de PCR. Las cepas mutantes carentes de genes se generaron por la técnica *Red-Swap* (Datsenko & Wanner, 2000) y las cepas etiquetadas con el epítopo 3×FLAG se generaron utilizando la técnica descrita en (Uzzau, Figueroa-Bossi, Rubino, & Bossi, 2001). Con el fin de generar la cepa receptora para la posterior construcción de cepas mutantes en los genes de estudio, la cepa *S.* Typhi STH2370 silvestre, se inoculó en 2 mL de medio líquido LB, y luego se incubó a 37 °C en agitación durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a 13000 rpm por 2 min. El *pellet* se lavó 4 veces con 1,5 mL de glicerol 10% estéril y frío (4 ºC) preparado en agua ultrapura. Posteriormente, se resuspendió el *pellet* en 100 µL de glicerol 10% estéril, el cual fue dividido en 2 tubos con 90 µL y 10 µL respectivamente. Los 10 µL se utilizaron para inocular un tubo de cultivo con 1 mL de caldo LB, el cual se utilizó como control de transformación. Al volumen restante se le agregó 1 µL del plásmido pKD46, se transfirió el volumen final a una cubeta de electroporación fría (-20ºC) (Gene Pulser, Bio-Rad) y se procedió a electroporar las bacterias previamente lavadas (MicroPulser, Bio-Rad). Una vez finalizado esto, las bacterias electroporadas fueron recuperadas en 1 mL de caldo LB sin antibiótico. El control y las bacterias transformadas se incubaron durante 60 min a 30 ºC con agitación. Finalmente, el cultivo se sembró en placas de agar LB-Amp y se incubó a 30 °C durante toda la noche. Un inóculo de la cepa receptora (STH2370/pKD46) se incubó a 30°C en medio líquido LB + Amp durante toda la noche. Al día siguiente, 30 µL de la cepa receptora, fueron inoculados en 30 ml de LB + Amp, suplementados con 500 µL de arabinosa (0,1 M). Cuando el cultivo alcanzó una OD_{600} de 0.4-0.5, se recolectaron las bacterias por centrifugación (8000 rpm por 10 min. a 4 °C) y se prepararon bacterias electrocompetentes

como se describió anteriormente, salvo algunas modificaciones. Para lavar las bacterias, se utilizaron 30 mL de glicerol 10% estéril y frío (4 ºC), y se centrifugaron a 8000 rpm por 10 min. Paralelamente, se purificó el producto de PCR destinado a insertarse en el gen de interés de la cepa receptora, usando E.Z.N.A. *Gel Extraction Kit* (Omega Bio-Tek). Posteriormente, se transfirió el volumen total a cubetas frías (-20 ºC) y se transformaron las cepas receptoras con este producto de PCR purificado mediante electroporación (MicroPulser, Bio-Rad). Inmediatamente después, se recuperó las bacterias transformadas en 1 mL de caldo LB sin antibiótico, y se incubaron durante 60 min a 37 °C. Finalmente, el cultivo se sembró en placas LB-Agar-Kan y se incubaron a 37 °C durante toda la noche.

4.5.5. Eliminación de *cassette* de resistencia flanqueado por secuencia FRT. Con el fin de eliminar el *cassete* de resistencia de las cepas mutantes, se efectuó recombinación sitio-específica utilizando el plásmido pCP20 (Tabla 2). El proceso de transformación se realizó de la misma forma al descrito en 4.4.5. Las colonias resultantes se sembraron posteriormente en medio LB sólido, y paralelamente en una placa LB + Kan. Luego se incubaron a 37 ºC toda la noche. Finalmente se seleccionaron aquellas cepas sensibles a los antibióticos seleccionados mediante screening.

4.6. Comprobación de cepas mutantes.

4.6.1. Comprobación de cepas mutantes por PCR. Las cepas mutantes se confirmaron por la amplificación del *cassette* de resistencia *aph* o la cicatriz FRT mediante PCR, utilizando partidores externos para los genes de interés correspondientes (Tabla 3). Las colonias de las mutantes confirmadas se aislaron nuevamente en placas de agar LB sin antibiótico, o suplementado con el antibiótico correspondiente. Adicionalmente, las mutantes etiquetadas con el epítopo 3×FLAG fueron chequeadas por secuenciación.

4.6.2. Secuenciación de DNA. Las mutantes etiquetadas con el epítopo 3×FLAG fueron secuenciadas en Pontificia Universidad Católica de Chile, mediante ABI PRISM 3500 xl Applied Biosystems (Financiado por *CONICYT – FONDEQUIP EQM150077)* utilizando partidores externos al sitio de la mutación (Tabla 3). Los fragmentos secuenciados fueron amplificados con la enzima de alta fidelidad *Herculase II fusion DNA polymerase* (Agilent Technologies). Las secuencias de DNA fueron recibidas en formato *GenBank* y la identidad de las fusiones génicas se analizó mediante alineamiento múltiple en el *software Snapgene* (GSL Biotech LLC).

4.7. Detección de efectores en OMVs.

4.7.1. Inmunodetección por *Western Blot.* En primer lugar, se realizó un SDS-PAGE tal como se describe anteriormente, a excepción de la adición de tinción One-Step Blue (Biotium). Posteriormente se montó el sándwich el cual contaba con los siguientes componentes y en el siguiente orden: 1 almohadilla de fibra, 2 papeles filtro, una membrana de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0,45 μm (Whatman), el gel de acrilamida, 2 nuevos papeles filtro y otra almohadilla de fibra. El sándwich se mantuvo siempre húmedo con buffer de transferencia (glicina 1,44 %, Tris 0,3 %, SDS 0,1% y metanol 20%), y se eliminaron las burbujas entre las capas. Este sistema se cubrió con 2 soportes de plástico, formando el *cassette*, el cual se colocó en la cámara de transferencia. A la cámara de transferencia se le agregó *buffer* de transferencia hasta llenarla. La transferencia se llevó a cabo a 100 V con 300 mA constantes por 1,5 h. La transferencia de proteínas en la membrana de nitrocelulosa se confirmó utilizando Ponceau S Staining Solution (Invitrogen) según el protocolo del fabricante. Posteriormente se bloqueó la membrana con una solución de leche descremada al 5% diluida en TBS (1,4% de NaCl, 0,6% glicina) y se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente con agitación. Al día siguiente se hicieron 4 lavados de esta membrana

con una solución de TBS-Tween (1,4% de NaCl, 0,6% glicina, 0,1% de Tween-20), de 5 min. cada uno. Luego se incubó la membrana con el anticuerpo primario de ratón anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich), previamente diluido en leche al 1% en una proporción de anticuerpo de 1:5000. La incubación del anticuerpo primario se realizó con agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente la membrana se lavó con una solución de TBS-Tween, tal como se realizó anteriormente. Luego se incubó en agitación a temperatura ambiente por 1,5 h con anticuerpo secundario de conejo Anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina (Invitrogen) previamente diluido en leche al 1% en una proporción de anticuerpo de 1:6000. La membrana se lavó nuevamente con TBS-Tween y se reveló utilizando el *kit* BCIP/NBT (Invitrogen), siguiendo el protocolo del fabricante.

4.8. Cinética de internalización de OMVs.

4.8.1. Tinción de OMVs con DiO. Las OMVs purificadas (100 μg/ml) se marcaron con perclorato de 3,3′-dioctadeciloxacarbocianina (DiO; sonda molecular) al 1% (v/v) durante 20 min a 37°C (Turner et al., 2018a). El exceso de tinción se eliminó lavando las OMV dos veces con PBS y una vez con DMEM (sin SFB ni rojo de fenol) utilizando una columna de filtración de 100 kDa MWCO (Amicon) a 4.000 × g durante 15 minutos en cada lavado, como sugiere el fabricante. Las OMV teñidas con DiO se almacenaron a 4 °C durante un máximo de 3 semanas.

4.8.2. Cinética de internalización de OMVs. Se trataron 2×10^6 de células HT-29 en 1 mL con DMEM filtrado 100 μg/mL de OMVs previamente marcadas con DiO durante 7 horas en condiciones de cultivo celular normal (37°C, 5% de CO_2). Se lavó con PBS para eliminar las OMVs no internalizadas. Las intensidades de fluorescencia se midieron utilizando el citómetro de flujo FACSAria III (Becton Dickinson). Para determinar la proporción de OMVs internalizadas, la fluorescencia extracelular de OMV-DiO se apagó con azul tripán,

que no entra en las células vivas y nos permite apagar sólo las OMVs localizadas en el extracelular (Bielaszewska et al., 2013; Hed, Hallden, Johansson, & Larsson, 1987). Las muestras se aplicaron al citómetro, y se midió la fluorescencia para la cantidad total de OMVs asociadas a la célula, y luego las muestras se incubaron con azul tripán (concentración final = 0,25% (p/v)) durante cinco minutos y se midió para ver sólo la señal de OMVs internalizadas. Los datos se analizaron utilizando FACSDiva versión 8.0.2 (Becton Dickinson). El blanco se fijó con células incubadas con OMVs, pero sin DIO y se restó la fluorescencia de las células tratadas con OMVs marcadas con DiO.

4.9. Entrega de efectores a células epiteliales a través de OMVs.

4.9.1. Inmunofluorescencia en bacterias. Se añadieron 50 µL de un cultivo estacionario crecido en medio LB con alta osmolaridad sobre un cubreobjetos de 12 mm de diámetro previamente tratado con poli-L-lisina. Se dejó secar los cubreobjetos con bacterias durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, se lavó 3 veces con PBS y se fijaron las bacterias con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 min. Se lavó 3 veces con PBS y se permeabilizó con lisozima (10 mg/mL) durante 1 hora a 37 °C. Se lavó y se bloqueó durante toda la noche con albúmina de suero bovino (BSA) al 5% en cámara húmeda. Al día siguiente, se lavó e incubó durante 2 horas en cámara húmeda con el anticuerpo primario de ratón anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich), previamente diluido en BSA al 5% en una proporción de anticuerpo de 1:20. Luego, se lavó 4 veces con PBS y se incubó durante 2 horas en cámara húmeda con el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón acoplado al fluoróforo Alexa 594 (Cell Signaling) previamente diluido en BSA al 5% en una proporción de anticuerpo de 1:500. Posteriormente, se lavó y se tiñó el DNA con Hoechst 33342 (Invitrogen) a una concentración de 10 µg/mL por 30 min. Finalmente se montó en medio de montaje Fluoromount-G (Invitrogen) y se observó en microscopio de epifluorescencia.

4.9.2. Inmunofluorescencia en células. Se sembraron células HT-29 en cubreobjetos de 12 mm de diámetro dentro de una placa de 24 pocillos a una densidad de 2×10^5 células por pocillo en 1 mL de medio completo y fueron cultivadas durante aproximadamente 15 horas. Las células se lavaron 3 veces con PBS y para detectar efectores en células HT-29 se agregó 50 μg de OMVs previamente marcadas con DiO (1% v/v) a las células y se incubó en 1 mL de medio completo a 37 °C y con 5% de CO_2 durante 2h. Finalizado los respectivos tiempos de incubación, las muestras se lavaron PBS y se fijó la muestra con PFA al 4 % durante 10 min. Las células fijadas se lavaron 3 veces con PBS y fueron permeabilizadas con tritón 0,1% por 15 min. Se lavó y se bloqueó durante toda la noche con BSA al 5% en cámara húmeda. Al día siguiente, se lavó e incubó durante 2 horas en cámara húmeda con el anticuerpo primario de ratón anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich), previamente diluido en BSA al 5% en una proporción de anticuerpo de 1/20. Luego, se lavó 4 veces con PBS y se incubó durante 2 horas en cámara húmeda con el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón acoplado al fluoróforo Alexa 594 (Cell Signaling) previamente diluido en BSA al 5% en una proporción de anticuerpo de 1/500. Posteriormente, se lavó y se tiñó el DNA con Hoechst 33342 (Invitrogen) a una concentración de 5 μg/mL por 20 min. Luego, se lavó y se tiñó F-actina con faloidina-iFluor 647 (Abcam) 1× durante 1 hora. Finalmente se montó en medio de montaje Fluoromount-G (Invitrogen) y se observó en microscopio confocal.

4.8.3. Construcción de fusiones genéticas con *bla*. Las fusiones genéticas entre las regiones codificantes de efectores de *S.* Typhi con la región codificante de β-lactamasa (*bla*) se realizaron utilizando *Gibson Assembly* (Invitrogen) según el protocolo del fabricante. Brevemente, se amplificaron por PCR las regiones codificantes de los efectores y *bla* (excluyendo el péptido señal), utilizando la enzima de alta fidelidad *Herculase II fusion DNA polymerase* con los partidores señalados en la Tabla 3. Los insertos purificaron utilizando

PCR *Clean-Up Kit* (Sigma-Aldrich) según el protocolo del fabricante. Luego, se mezcló 100 ng de pBAD33.1, 3 veces de exceso molar de efector (ej. *sipC*) y *bla*, 10 μL de mix de reacción y agua libre de nucleasas hasta completar 20 μL. La mezcla se incubó a 50 °C durante 2 horas. En este punto, las fusiones genéticas se clonaron río abajo del promotor P_{araBAD} del plásmido pBAD33.1, generando los plásmidos pBAD33.1::*sipB-bla* y pBAD33.1::*sipC-bla.* Posteriormente, los plásmidos se purificaron utilizando PCR *Clean-Up Kit* y se electroporaron bacterias de *Escherichia coli* Top10, tal como se describió anteriormente. Las fusiones genéticas se chequearon por PCR y se secuenciaron tal como se describió anteriormente.

4.8.4. Ensayo de actividad β-lactamasa como reportero. Se sembraron 5×10^4 células HT-29 en placas de 96 pocillos. Se incubaron durante 4 h OMVs obtenidas desde bacterias de *S.* Typhi portadoras de pBAD33.1::*sipB-bla* o pBAD33.1::*sipC-bla* inducidas con L-Arabinosa (1.33 μmol/L). Luego, se agregó CCF4-AM LiveBLAzer™ FRET-B/G Loading Kit (Invitrogen) y se siguió las indicaciones del fabricante. Las lecturas de fluorescencia se realizaron en el lector de placas Synergy H1 (Biotek). La longitud de onda de excitación utilizada fue 410 nm, y las longitudes de onda de emisión fueron 450 y 520 nm.

5. RESULTADOS

A) Caracterizar OMVs de *S.* Typhi provenientes de una condición de cultivo con alta osmolaridad.

5.1. La alta osmolaridad promueve la producción de OMVs.

La liberación de OMVs constituye una respuesta frente a estrés, por ejemplo, factores ambientales como la exposición frente a antibióticos promueve la producción de OMVs (Schwechheimer & Kuehn, 2015). Sin embargo, factores ambientales presentes en el ciclo infectivo de las bacterias también podrían considerarse como agentes estresores. Por esta razón, nos preguntamos si la alta osmolaridad favorece la producción de OMVs de *S.* Typhi. Para esto, se crecieron bacterias hasta fase estacionaria y obtuvimos OMVs desde condiciones de cultivo con alta osmolaridad (NaCl 300 mM) y condición estándar (LB). Cuantificamos el contenido proteico y lipídico de OMVs, y también cuantificamos las bacterias desde las cuales se obtuvieron las OMVs. De esta manera, calculamos el rendimiento por condición de cultivo dividiendo el contenido proteico y lipídico de OMVs normalizando al dividir en las unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) por el volumen de cultivo del cual se obtuvieron las OMVs. Como se observa en la Figura 2, se encontró un aumento en el contenido proteico y lipídico en OMVs obtenidas desde condición de cultivo con alta osmolaridad, respecto condición de cultivo estándar, lo que se ha interpretado previamente como un aumento en la producción de OMVs (Deatherage et al., 2009; Schwechheimer & Kuehn, 2015).

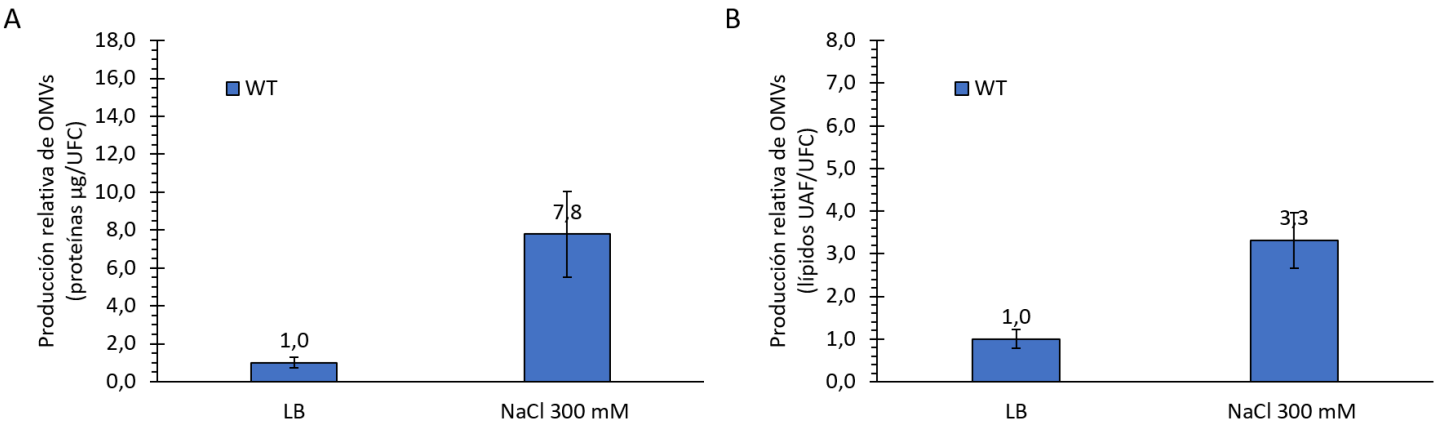


Figura 2. La alta osmolaridad promueve la producción de OMVs. Producción de OMVs de *S.* Typhi en condición de cultivo estándar (LB) o alta osmolaridad (NaCl 300 mM). Las OMVs fueron cuantificas por **A.** Proteínas y **B.** Lípidos. La producción relativa de OMVs se calculó cuantificando el contenido proteico y lipídico de OMVs en las unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) por el volumen de cultivo del cual se obtuvieron las OMVs. (n = 2).

5.2. La alta osmolaridad modula el cargamento de proteínas en OMVs de *S.* Typhi.

Las condiciones de cultivo bacteriano pueden modificar o modular el cargamento proteico de OMVs (Orench-Rivera & Kuehn, 2016). Para estudiar esto, se obtuvieron OMVs de *S.* Typhi desde condiciones de cultivo con alta osmolaridad (NaCl 300 mM) y condiciones estándar de laboratorio (LB). Los perfiles de proteínas se comparon por SDS-PAGE (Figura 3). Como resultado, encontramos que existen diferencias en el cargamento de proteinas de OMVs obtenidas desde condiciones de cultivo con alta osmolaridad respecto condiciones de cultivo estándar, lo que se evidencia por la aparición de nuevas bandas y aumento en la intesidad de otras. Tal como se esperaba, la alta osmolaridad cambia o modula el cargamento proteico de OMVs de *S.* Typhi.

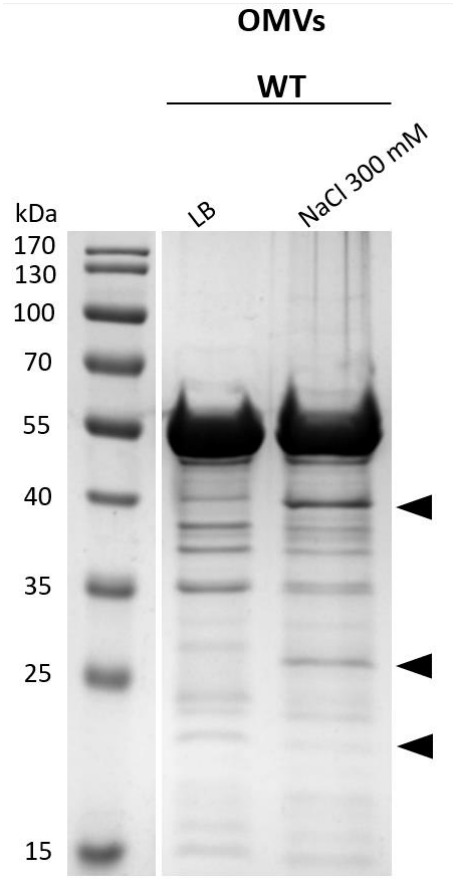


Figura 3. La alta osmolaridad modula el cargamento de proteínas de OMVs de *S.* Typhi. Perfil de proteínas de OMVs de *S.* Typhi obtenidas desde condiciones estándar de laboratorio (LB) y condiciones de cultivo con alta osmolaridad (NaCl 300 mM). En cada carril se cargó 30 µg de proteína. Con puntas de flechas se señalan algunas de las diferencias entre los perfiles de proteínas de OMVs. El estándar utilizado es *PageRuler*^{TM} *Prestained Protein Ladder* (Invitrogen). (Experimento representativo n = 2).

5.3. Detección de efectores en OMVs: Construcción de mutantes.

La alta osmolaridad corresponde a una señal ambiental importante en el ciclo infectivo de *Salmonella* que promueve la expresión de proteínas asociadas a virulencia (Arricau et al., 1998; Lou et al., 2019), y también modula el cargamento proteico en OMVs (Figura 3). Considerando lo anterior, nos preguntamos si la alta osmolaridad aumenta la carga de proteínas asociadas a virulencia, como SipB y SipC, en OMVs de *S.* Typhi. Para responder esta pregunta primero construimos mutantes *sipB* y *sipC* de *S.* Typhi etiquetadas con el epítopo 3×FLAG utilizando la técnica descrita en (Uzzau et al., 2001). En la Figura 4 se muestra un esquema que representa la construcción de las mutantes, indicando la inserción del epítopo 3×FLAG en el extremo 3' de las regiones codificantes de *sipB* y *sipC.* También se indican los partidores utilizados para revisar la construcción y tamaños de amplicón

esperados en cada caso. Los partidores utilizados para construir y revisar las mutantes se indican en la Tabla 3, la cual se encuentra en anexo.

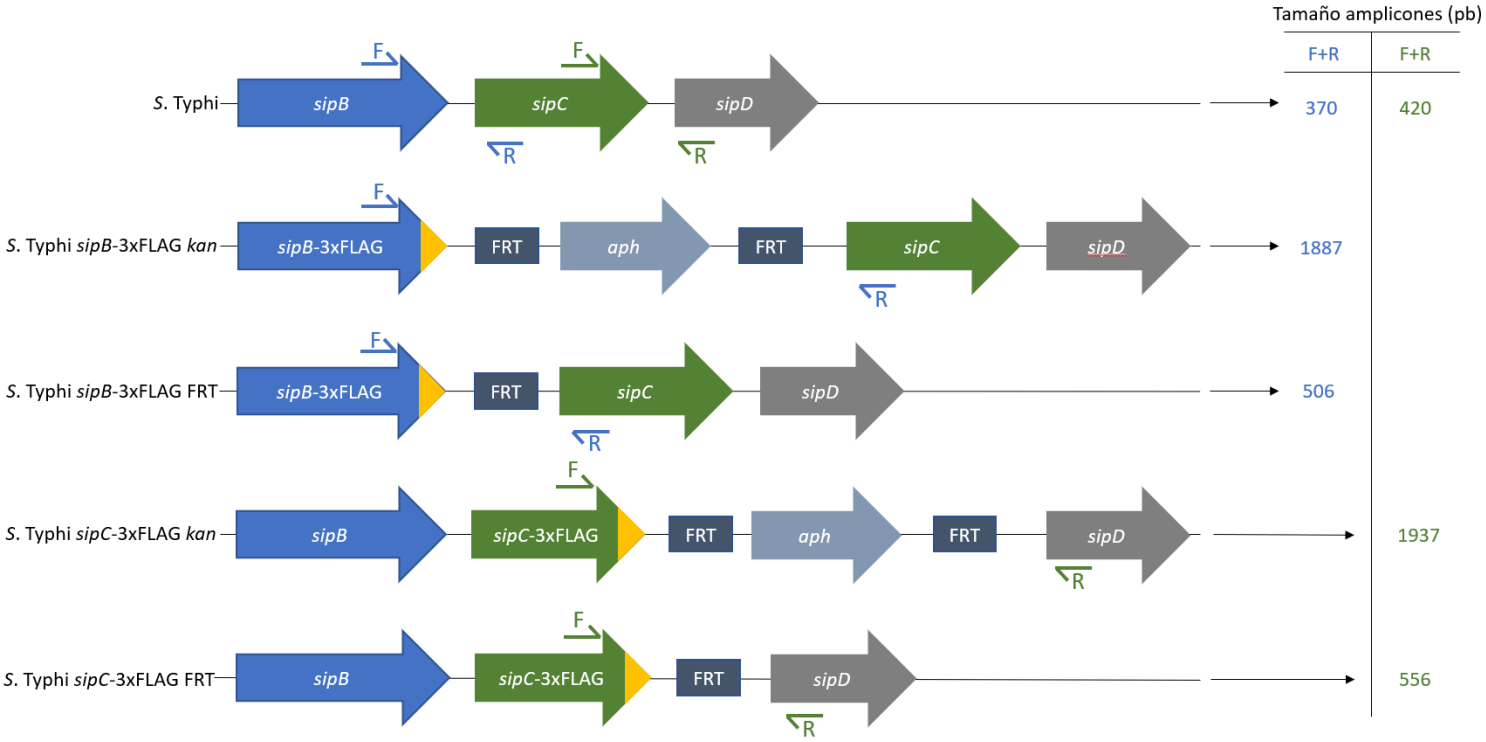


Figura 4. Esquema de construcción de mutantes. Representación esquemática del contexto genético *sipB* y *sipC* en *S.* Typhi e inserción del epítopo 3×FLAG. En todos los casos con F y R se indican los partidores comprobatorios *forward* (F) y *reverse* (R) utilizados para chequear las mutantes (Tabla 3) y también se indica el amplicón esperado con cada par de partidores comprobatorios. Con **azul** y **verde** se indican los partidores comprobatorios utilizados F y R para *sipB* y *sipC*, respectivamente. Con **amarillo** se representa la inserción de epítopo 3×FLAG. Con **calipso** se indica la cicatriz **FRT (minimal)** obtenida luego de la mutación por la técnica de Uzzau.

5.4. Detección de efectores en OMVs: Chequeo construcción de mutantes.

Para revisar las mutantes se amplificó por PCR utilizando partidores externos a la región de la mutación. En la Figura 5 se muestran los amplicones obtenidos para las mutantes *sipB*-3×FLAG y *sipC*-3×FLAG. Los amplicones obtenidos en todos los casos corresponden a lo esperado (tamaños de amplicones señalados en la Figura 5). Vale mencionar que en el caso de la mutante *sipC*-3×FLAG *aph* existen bandas inespecíficas. Estas bandas inespecíficas pueden ser eliminadas mejorando las condiciones de PCR, por ejemplo, elevando a temperatura de alineamiento de la reacción. Sin embargo, hasta este punto, las

mutantes construidas al ser revisadas por PCR sugieren una correcta construcción ya que los amplicones obtenidos corresponden al tamaño esperado.

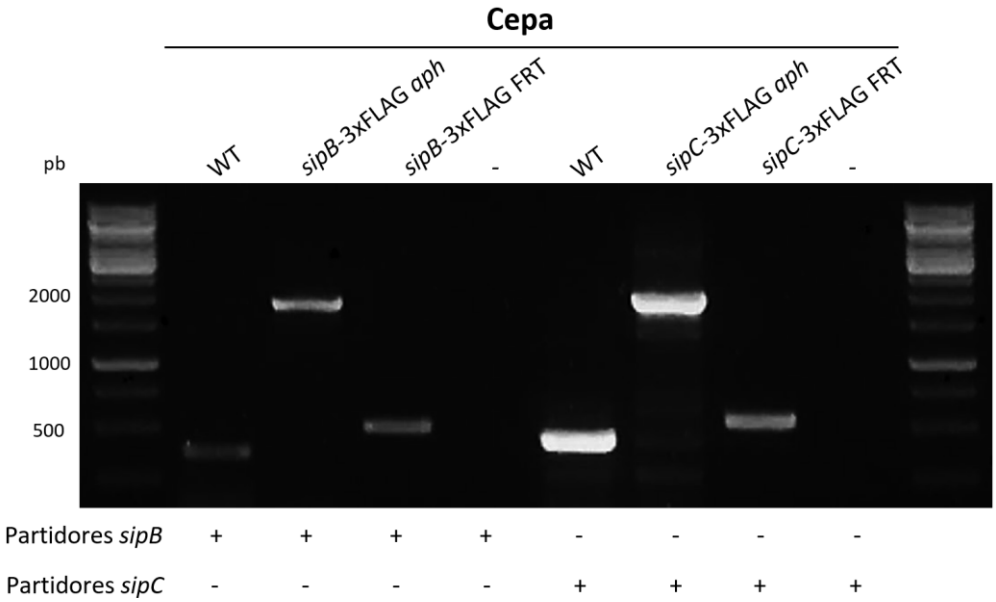


Figura 5. Construcción de mutantes *sipB* y *sipC* etiquetadas con el epítopo 3x-FLAG. Electroforesis en gel de agarosa 1% en el que se cargaron los productos de PCR comprobatorios para las mutantes *sipB*-3×FLAG y *sipC*-3×FLAG. WT indica la cepa silvestre de *S.* Typhi y – indica control sin templado. El estándar utilizado es *GeneRuler^{TM} 1 kb DNA Ladder* (Invitrogen).

5.5. Detección de efectores en OMVs: Secuenciación de mutantes.

Para garantizar que la adición de la región codificante para el epítopo 3×FLAG ocurrió en marco con la región codificante de *sipB y sipC*, decidimos secuenciar la mutantes. Los amplicones secuenciados se generaron utilizando los partidores comprobatorios externos al sitio de mutación y con la enzima de alta fidelidad *Herculase II fusion DNA polymerase* (Agilent Technologies). Como resultado de la secuenciación, en la Figura 6 (A) se muestra el contexto genético de *sipB* y *sipC* obtenido desde (C. Valenzuela et al., 2014). En (B) y (C) se muestra un esquema del resultado de la secuenciación de la cepa silvestre (control) y la cepa *sipB*-3×FLAG, respectivamente, con partidores externos para *sipB*. En (D) y (E) se muestra un esquema del resultado de la secuenciación de la cepa silvestre (control) y la cepa *sipC*-3×FLAG, respectivamente, con partidores externos para *sipC*. Como resultado, en todos

los casos se muestra que las mutantes etiquetadas con 3×FLAG poseen dicho epítopo y también poseen la secuencia FRT producto de la técnica utilizada.

En la Figura 7 y Figura 8 se muestra un alineamiento múltiple de *sipB*-3×FLAG y *sipC*-3×FLAG, respectivamente, alineadas con la cepa silvestre secuenciada (control) y el genoma de referencia obtenido de (C. Valenzuela et al., 2014). Encontramos río abajo del sitio de mutación, específicamente en el extremo de los fragmentos secuenciados, en todos los casos encontramos algunas mutaciones como sustituciones, deleciones o inserciones. Es muy probable que estos cambios encontrados en el extremo de los fragmentos sean un artefacto de la técnica de secuenciación de secuenciación capilar. En la técnica de secuenciación capilar usualmente los extremos del fragmento no son considerados debido a una baja calidad de la secuenciación en ese punto (Crossley et al., 2020). En C y D de la Figura 7 y Figura 8 se muestran cromatogramas con la calidad de la secuenciación, y se puede observar que en el extremo de los fragmentos la calidad de secuenciación es muy baja, tal como se esperaba por bibliografía (Crossley et al., 2020). Además, por ejemplo, en el caso de la secuenciación de la cepa silvestre con partidores externos para *sipB,* se muestra que existe un *gap* en la región codificante de *sipC* (Figura 7 B). Dicho *gap* desplazaría el marco de lectura y generaría una proteína distinta de SipC, y se ha reportado que la falta de SipC no permite la invasión de *Salmonella.* En este sentido, la misma cepa silvestre que fue secuenciada es capaz de invadir (Figura 28, anexo). Así, los datos de invasión en conjunto con el cromatograma que revela la calidad de la secuenciación en el extremo de los fragmentos sugieren que los cambios encontrados río abajo del epítopo 3xFLAG son un artefacto de la técnica de secuenciación. Entonces, obviando los artefactos producto de la técnica de secuenciación, encontramos como resultado que las cepas mutantes, respecto la cepa silvestre, no poseen el codón de término nativo, sino que fue reemplazado por el epítopo

3×FLAG que se encuentra fusionado en marco con la región codificante de *sipB y sipC*, respectivamente.

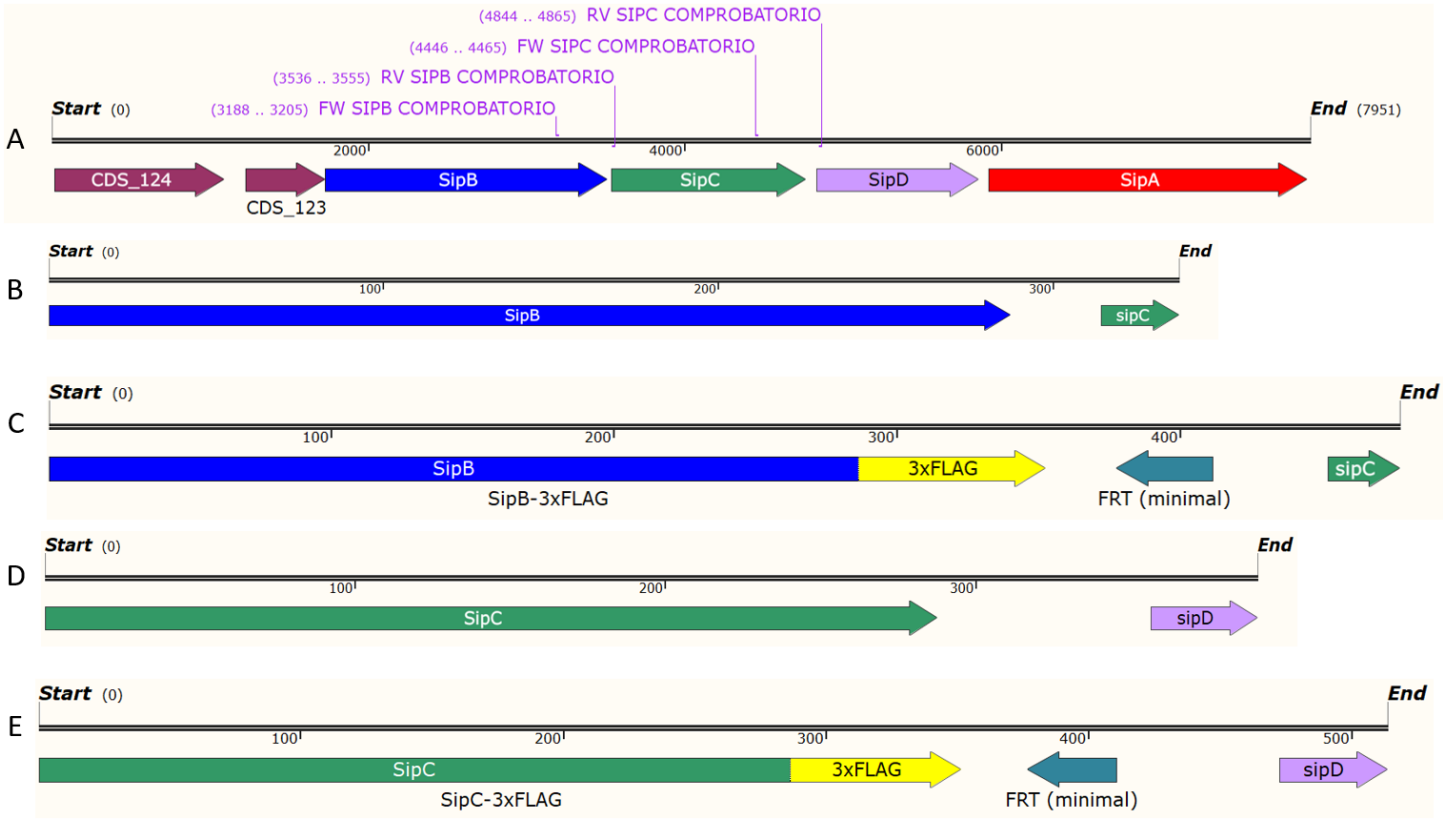


Figura 6. Esquema obtenido luego de la secuenciación de las mutantes *sipB*-3×FLAG y *sipC*-3×FLAG. A. Contexto genético de ***sipB*** y ***sipC***. Con **azul** se indica la región codificante de ***sipB*** y con **verde** la región codificante de *sipC*. Con letras **púrpura** se indican los partidores utilizados para secuenciar y también se señala aproximadamente en qué región alinean. Con **amarillo** se indica el epítopo **3×FLAG**. Con **calipso** se indica la cicatriz **FRT (minimal)** obtenida luego de la mutación por la técnica de Uzzau. **B** y **C.** Esquemas del resultado de secuenciación de la cepa silvestre y la cepa *sipB*-3×FLAG, respectivamente utilizando los partidores **FW *sipB* comprobatorio** y **RV *sipB* comprobatorio**. **D** y **E.** Esquema del resultado de secuenciación de la cepa silvestre y la cepa *sipC*-3×FLAG, respectivamente, utilizando los partidores **FW *sipC* comprobatorio** y **RV *sipC* comprobatorio**. Las imágenes corresponden a capturas obtenidas desde el *software Snapgene*, y se realizaron con los datos obtenidos de la secuenciación de la cepa silvestre y de las mutantes *sipB*-3×FLAG y *sipC*-3×FLAG.

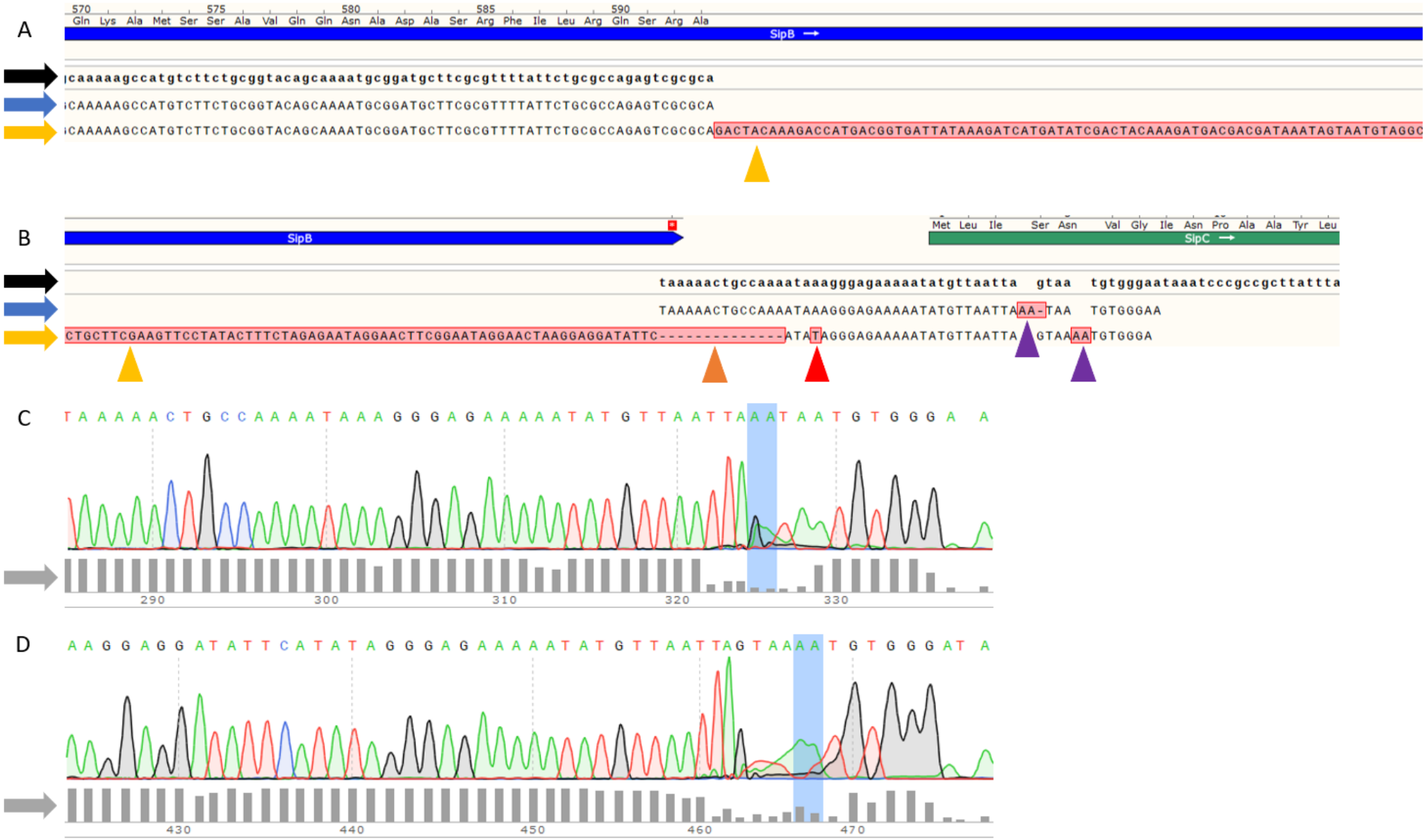

A
570 575 580 585 590
Gln Lys Ala Met Ser Ser Ala Val Gln Gln Asn Ala Asp Ala Ser Arg Phe Ile Leu Arg Gln Ser Arg Ala
SipB
caaaaagccatgtcttctgcggtacagcaaaatgcggatgcttcgcgttttattctgcgccagagtcgcgca
CAAAAAGCCATGTCTTCTGCGGTACAGCAAAATGCGGATGCTTCGCGTTTTATTCTGCGCCAGAGTCGCGCA
CAAAAAGCCATGTCTTCTGCGGTACAGCAAAATGCGGATGCTTCGCGTTTTATTCTGCGCCAGAGTCGCGCAGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGATATCGACTACAAAGATGACGACGATAAATAGTAATGTAGGC
B
SipB
Met Leu Ile Ser Asn Val Gly Ile Asn Pro Ala Ala Tyr Leu
SipC
taaaaactgccaaaataaagggagaaaaatatgttaatta gtaa tgtgggaataaatcccgccgcttattta
TAAAAACTGCCAAAATAAAGGGAGAAAAATATGTTAATTAAA-TAA TGTGGGAA
CTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTC----------ATATAGGGAGAAAAATATGTTAATTA GTAAAATGTGGGA
C
T A A A A A C T G C C A A A A T A A A G G G A G A A A A A T A T G T T A A T T A A A T A A T G T G G G A A
290 300 310 320 330
D
A A G G A G G A T A T T C A T A T A G G G A G A A A A A T A T G T T A A T T A G T A A A A T G T G G G A T A
430 440 450 460 470

Figura 7. Alineamiento múltiple mutante *sipB*-3×FLAG (página anterior). A y **B.** Extremo 3’ de la región codificante de *sipB*. Con flecha negra, azul y amarillo se indica la secuencia del genoma de referencia, secuenciación de la cepa silvestre como control y secuenciación de la mutante *sipB*-3×FLAG, respectivamente. Con un triángulo amarillo se indica la inserción del epítopo 3×FLAG presente en la mutante. Con triángulo naranja se indican *gaps* en la mutante entre las regiones codificantes para *sipB* y *sipC*. Con triángulo rojo se indica sustitución de A por T en la mutante etiquetada con 3×FLAG. Con triángulo morado se indican inserciones en la región codificante de *sipC* en las cepas silvestre y mutante. **C** y **D.** Cromatogramas de la secuenciación de la cepa silvestre y mutante, respectivamente. En ambos casos, con flecha gris se indica la calidad de la secuenciación a lo largo del fragmento. Con azul se señalan los nucleótidos señalados con triángulo morado en B.


A
390 395 400 405
Glu Ser Ile Asn Gln Ser Lys Ala Ser Ala Leu Ala Ala Ile Ala Gly Asn Ile Arg Ala
SipC
gagagcattaaccagtcgaaagcatccgcactcgctgctatcgcaggcaatattcgcgct
GAGAGCATTAACCAGTCGAAAGCATCCGCACTCGCTGCTATCGCAGGCAATATTCGCGCT
GAGAGCATTAACCAGTCGAAAGCATCCGCACTCGCTGCTATCGCAGGCAATATTCGCGCTGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGATATCGACTACAAAGATGACGACGATAAATAGTAATGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTA
B
410
SipC
1 5 10
Met Leu Asn Ile Gln Asn Tyr Ser Ala Ser Pro His
SipD
taatctgacagatcaactatacgccatcaggggggatttaatcgccctcctgatggcgaactggggatattatgcttaatattcaaaattattcc gcttctcctcat
TAATCTGACAGATCAACTATACGCCATCAGGGGGGGATTTAATCGCCCTCCTGATGGCGAACTGGGGATATTATGCTTAATATTCAAAATTATCCCCGCTTCTCC
CTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATA----------TTAATCGCCCTCCTGATGGCGAACTGGGGATATTATGCTTAATATTCAAAATTAT
C
GATGGCGAACTGGGGATATTATGCTTAATATTCAAAATTATCCCCGCTTCTCCA
340 350 360 370 380 390
D
CGAACTGGGGATATTATGCTTAATATTCAAAATTATAAAAGCTAATTCCACCAAAA
460 470 480 490 500 510

Figura 8. Alineamiento múltiple mutante *sipC*-3×FLAG (página anterior). A y **B.** Extremo 3’ de la región codificante de *sipB*. Con flecha negra, azul y amarillo se indica la secuencia del genoma de referencia, secuenciación de la cepa silvestre como control y secuenciación de la mutante *sipC*-3×FLAG, respectivamente. Con un triángulo amarillo se indica la inserción del epítopo 3×FLAG presente en la mutante. Con triángulo naranja se indican *gaps* en la mutante entre las regiones codificantes para *sipC* y *sipD*. Con triángulo rojo se indica sustitución de T por C en cepa silvestre. Con triángulo morado se indica inserción en la región codificante de *sipD* en la cepa silvestre. **C** y **D.** Cromatogramas de la secuenciación de la cepa silvestre y mutante, respectivamente. En ambos casos, con flecha gris se indica la calidad de la secuenciación a lo largo del fragmento. Con azul se señala la sustitución e inserción en la cepa silvestre señalados con triángulo morado en B.

5.6. Producción de OMVs mutantes *sipB*-3×FLAG y *sipC*-3×FLAG

Previamente mostramos que la alta osmolaridad aumenta el contenido de proteínas y lípidos en OMVs de *S.* Typhi (Figura 2), lo que se ha interpretado anteriormente como un aumento en la producción de OMVs (Deatherage et al., 2009; Schwechheimer & Kuehn, 2015). Como control, decidimos comparar la producción de OMVs de las mutantes *sipB*-3×FLAG y *sipC*-3×FLAG en condiciones de cultivo con alta osmolaridad y estándar de laboratorio. Como resultado, encontramos, al igual que en la cepa parental, que la alta osmolaridad aumenta el contenido de proteínas y lípidos en OMVs de las mutantes *sipB*-3×FLAG y *sipC*-3×FLAG, respecto a la condición estándar de cultivo (Figura 9). Lo que se interpreta como un aumento en la producción de OMVs (Deatherage et al., 2009; Schwechheimer & Kuehn, 2015).

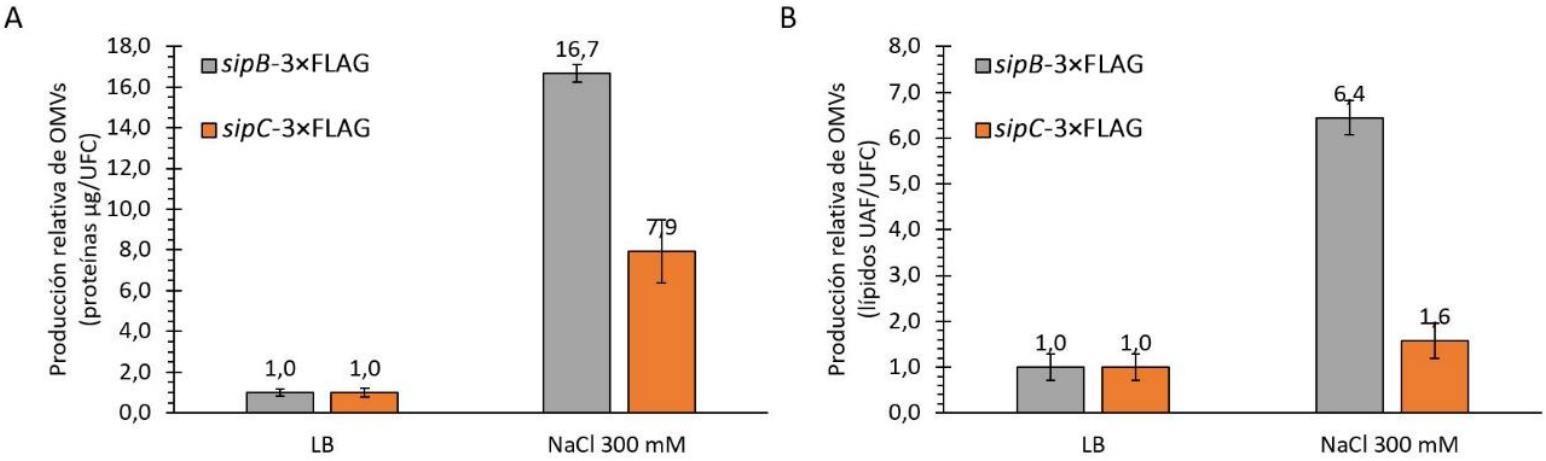


Figura 9. Producción de OMVs en mutantes etiquetadas con el epítopo 3×FLAG. Producción de OMVs de *S.* Typhi *sipB*-3×FLAG y *S.* Typhi *sipC*-3×FLAG en condición de cultivo estándar (LB) o alta osmolaridad (NaCl 300 mM). Las OMVs fueron cuantificas por **A.** Proteínas y **B.** Lípidos. La producción relativa de OMVs se calculó cuantificando el contenido proteico y lipídico de OMVs en las unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) por el volumen de cultivo del cual se obtuvieron las OMVs. (n = 3).

5.7. Perfil de proteínas en OMVs de mutantes *sipB*-3×FLAG y *sipC*-3×FLAG

Previamente mostramos que la alta osmolaridad modula el cargamento de proteínas de OMVs de *S.* Typhi (Figura 3). Como control, decidimos comparar el cargamento de proteínas de OMVs de las mutantes *sipB*-3×FLAG y *sipC*-3×FLAG en condiciones de cultivo con alta osmolaridad y estándar de laboratorio, respecto a la cepa parental. Como resultado, encontramos, al igual que en la cepa parental, la alta osmolaridad modula el cargamento de proteínas de OMVs. Los perfiles de proteínas de las mutantes *sipB*-3×FLAG y *sipC*-3×FLAG en condiciones de cultivo con alta osmolaridad y estándar de laboratorio son similares los que presenta la cepa parental en dichas condiciones de cultivo (Figura 10).

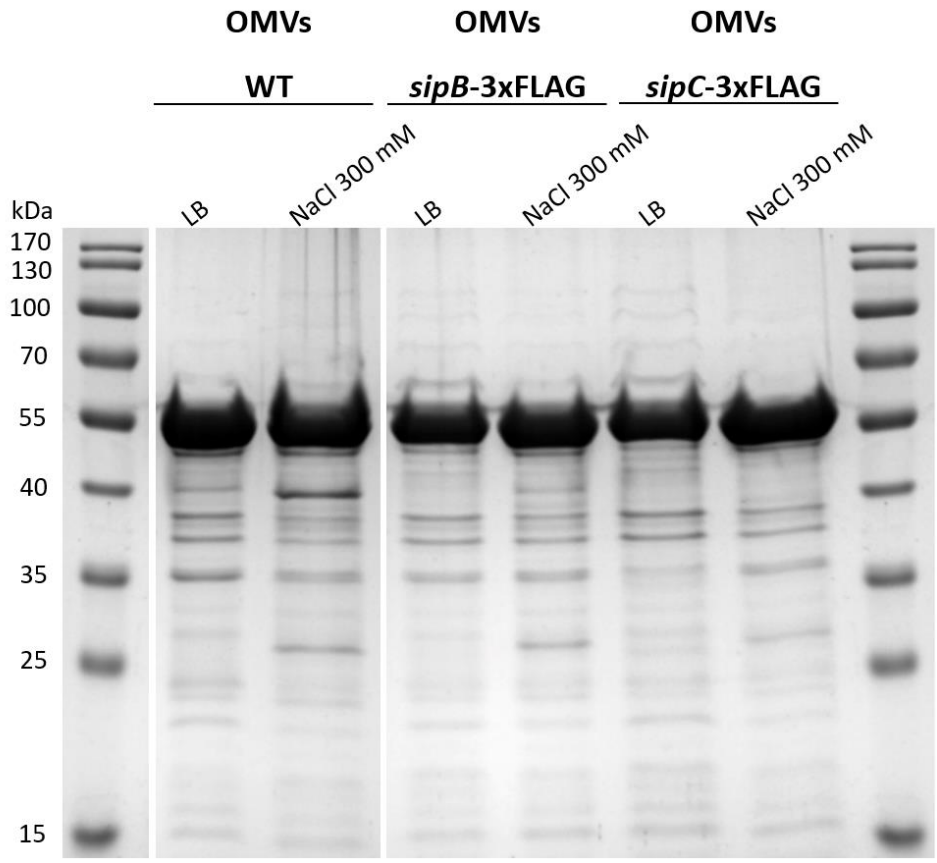


Figura 10. Perfil de proteínas mutantes etiquetadas con el epítopo 3×FLAG. Perfil de proteínas de OMVs de *S.* Typhi silvestre (WT), *S.* Typhi *sipB*-3×FLAG y *S.* Typhi *sipC*-3×FLAG obtenidas desde condiciones estándar de laboratorio (LB) y condiciones de cultivo con alta osmolaridad (NaCl 300 mM). En cada carril se cargó 30 µg de proteína. El estándar utilizado es *PageRuler*^{TM} *Prestained Protein Ladder* (Invitrogen). (n = 1).

5.8. La alta osmolaridad aumenta la carga de SipC en OMVs de *S.* Typhi.

Con las mutantes de *S.* Typhi *sipB*-3×FLAG y *S.* Typhi *sipC*-3×FLAG construidas, podemos respodender nuestra pregunta de trabajo. Como mencionamos anteriormente, nos preguntamos si la alta osmlaridad aumenta la carga de proteínas asociadas a virulencia, como SipB y SipC, en OMVs de *S.* Typhi. Sin embargo, previo a responder nuestra pregunta, para probar las mutantes detectamos SipC en lisado completo, SipB y SipC en sobrenadante en condiciones de cultivo estándar y alta osmolaridad, respectivamente (Figura 11). Para el control de carga, en ambas fases (sobrenadante y lisado completo) usamos anticuerpo primario de ratón anti-Hsp60. De esta manera detectamos Hsp60 como control de carga solo

en la fase de lisado completo y no en sobrenadante, ya que Hsp60 (60 kDa) es una proteína citoplasmática y no se detecta en sobrenadante (Jofré et al., 2014; Ortega et al., 2016), lo que muestra que no hay contaminación en las fases a detectar. Como resultado encontramos que es posible detectar SipC (43 kDa) en condiciones de cultivo con alta osmolaridad en lisado completo. En sobrenadante, no detectamos SipB (≈75 kDa) en condiciones de cultivo estándar, pero sí en condiciones de cultivo con alta osmolaridad. SipC en sobrenandante se detecta en condiciones de cultivo estándar, y en condiciones de cultivo con alta osmolaridad su abundancia aumenta. Entonces, tal como se esperaba y según lo descrito en la literatura, la secreción de SipB y SipC aumenta en condiciones de cultivo con alta osmolaridad (Arricau et al., 1998).

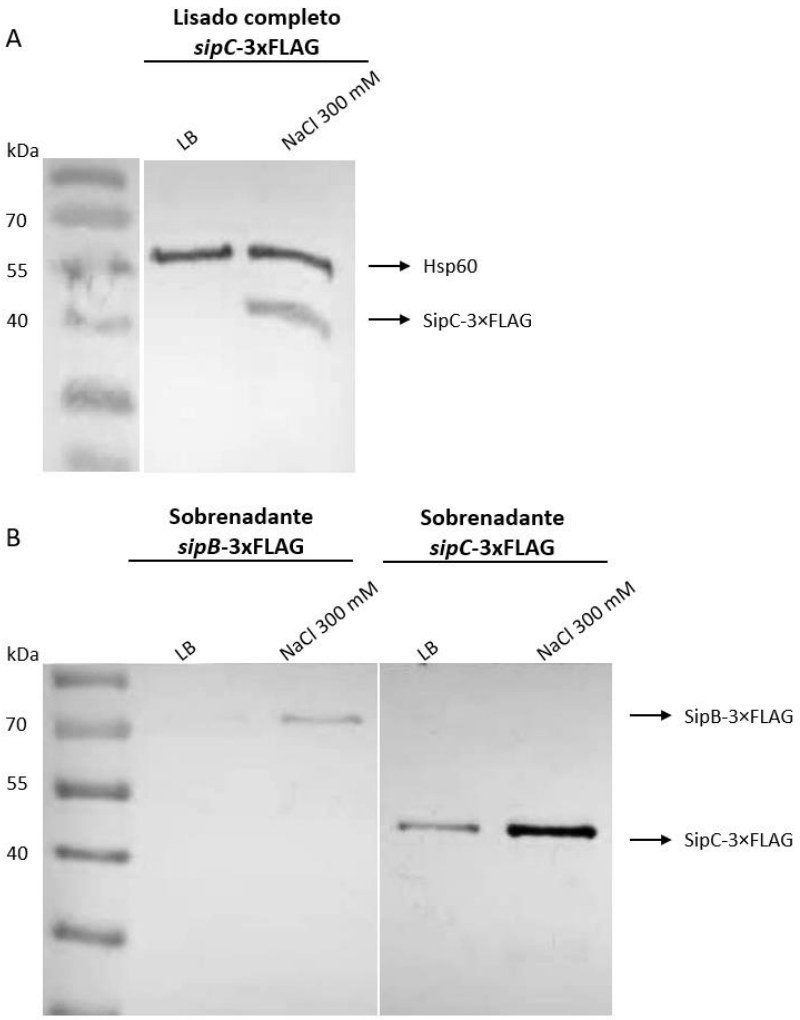


Figura 11. Inmunodetección de SipB y SipC por *Western Blot* (página anterior). A. Inmunodetección por *Western Blot* de SipC en lisado completo y **B.** Inmunodetección por *Western Blot* de SipB y SipC en sobrenadante. En **A** y **B** se cargó 50 µg de proteína y la detección de Hsp60 se usó como control de carga. (n = 2).

Tal como se muestra en la Figura 11, podemos detectar por *Western Blot* SipB y SipC luego de la construcción de las mutantes etiquetadas con el epítopo 3×FLAG. Por lo tanto, podemos responder la pregunta de trabajo: si la alta osmlaridad aumenta la carga de proteínas asociadas a virulencia, como SipB y SipC, en OMVs de *S.* Typhi. Para esto, obtuvimos OMVs de las mutantes etiquetadas con el epítopo 3×FLAG desde condiciones de cultivo con alta osmolaridad (NaCl 300 mM) y condiciones estándar de laboratorio (LB) y se realizó *Western Blot* para inmunodetectar SipB y SipC (Figura 12). Debido a que la condición de cultivo en estudio dificulta la elección de un *housekeeping* en OMVs, como control de carga realizamos tinción de proteínas transferidas a la membrana de nitrocelulosa con rojo Ponceau S (Invitrogen). Como resultado, detectamos SipC en OMVs de *S.* Typhi dentro del tamaño esperado (43 kDa). Encontramos que SipC es cargada en OMVs en condiciones de cultivo estándar. Además, encontramos que la alta osmolaridad aumenta la carga de SipC en OMVs de *S.* Typhi. En cuanto a SipB, al menos con la técnica utilizada no fue posible detectarlo en condiciones estándar ni en condiciones con alta osmolaridad.

Nos preguntamos si aumentando la sensibilidad del ensayo podríamos detectar SipB en OMVs de *S.* Typhi. Para esto, utilizamos un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés). La inmunodetección con HRP tiene algunas ventajas sobre la detección con fosfatasa alcalina, por ejemplo mayor sensibilidad y estabilidad de la reacción por más tiempo antes de la saturación, en comparación a fosfatasa alcalina (Beyzavi et al., 1987). Como resultado, al igual que con la reacción con fosfatasa

alcalina, no detectamos SipB en OMVs. Y en el caso de SipC, la alta osmolaridad aumenta su carga en OMVs (Figura 25, anexo).

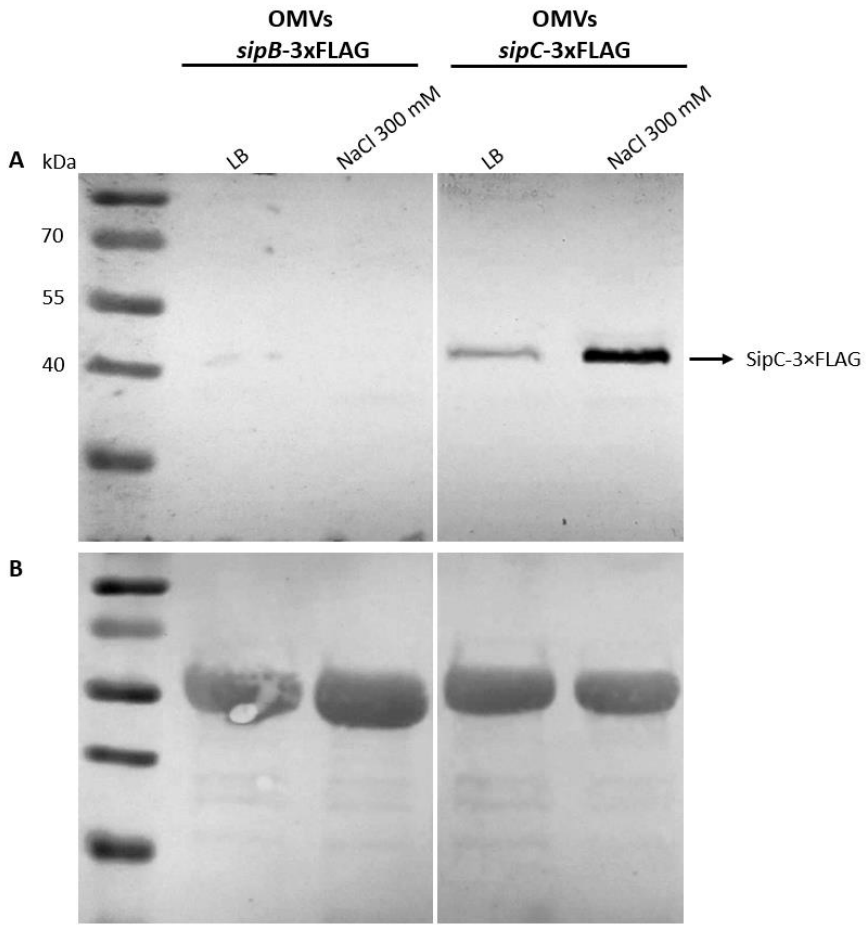


Figura 12. La alta osmolaridad aumenta la carga de SipC en OMVs de *S.* Typhi. A. Inmunodetección por *Western Blot* de SipB y SipC en OMVs de *S.* Typhi obtenidas desde condiciones estándar de laboratorio (LB) y condiciones de cultivo con alta osmolaridad (NaCl 300 mM). **B.** Tinción de proteínas transferidas a la membrana de nitrocelulosa con rojo Ponceau S como control de carga. En cada carril se cargó 30 µg de proteína. El estándar utilizado es *PageRuler*^{TM} *Prestained Protein Ladder* (Invitrogen). (n = 3).

B) Comparar la internalización de OMVs de *S.* Typhi provenientes de una condición de cultivo con alta osmolaridad respecto OMVs provenientes condiciones de cultivo estándar.

5.9. La alta osmolaridad favorece la internalización de OMVs de *S.* Typhi.

Antecedentes de nuestro laboratorio muestran que las OMVs de *S.* Typhi son capaces de ser internalizadas en células en cultivo. Adicionalmente, experimentos preliminares también muestran que la condición de cultivo puede cambiar la cinética de internalización de OMVs en células epiteliales. Nos preguntamos si la alta osmolaridad favorece la internalización de OMVs en células epiteliales, respecto condiciones de cultivo estándar. Para esto, marcamos OMVs con la sonda fluorescente DiO e incubamos las OMVs marcadas con células HT-29 durante 7 horas, midiendo fluorescencia en el citómetro de flujo cada hora. Para apagar la fluorescencia de las OMVs no internalizadas utilizamos azul de tripán, que además de apagar la fluorescencia de DiO, no es capaz de ser internalizado en células vivas por lo que solo apaga fluorescencia de OMVs marcadas con DiO en el extracelular (Bielaszewska et al., 2013). Es importante mencionar, que en nuestro laboratorio hemos explorado algunas condiciones de cultivo, como se mencionó anteriormente, entre ellas se encuentra por ejemplo la presencia de bilis y la microaerofilia. De esta manera, decidimos trabajar con alta osmolaridad, por lo que últimamente estamos interesados en comparar la alta osmolaridad (NaCl 300 mM) respecto sin NaCl (NaCl 0 mM), ya que se ha descrito que la baja osmolaridad reprime la expresión de la Isla de Patogenicidad I (LIM, YONG, RYU, & biotechnology, 2005). Comparando así una condición de cultivo virulenta respecto una avirulenta. Además, vale mencionar que en el experimento que se muestra a continuación (Figura 13), las OMVs obtenidas desde condiciones de cultivo estándar (LB) tienen problemas en su cuantificación. Como resultado encontramos que en las primeras horas no

existe diferencia en la tasa de internalización de OMVs, sin embargo, a partir de las 3 horas de internalización la tasa de OMVs obtenidas desde condición de cultivo con alta osmolaridad tiene un tasa de internalización aumentada, lo que se hace aún más evidente a partir de las 5 horas. Donde, como resultado encontramos que la alta osmolaridad favorece la internalización de OMVs de *S.* Typhi, lo que se condice con los resultados preliminares obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio.

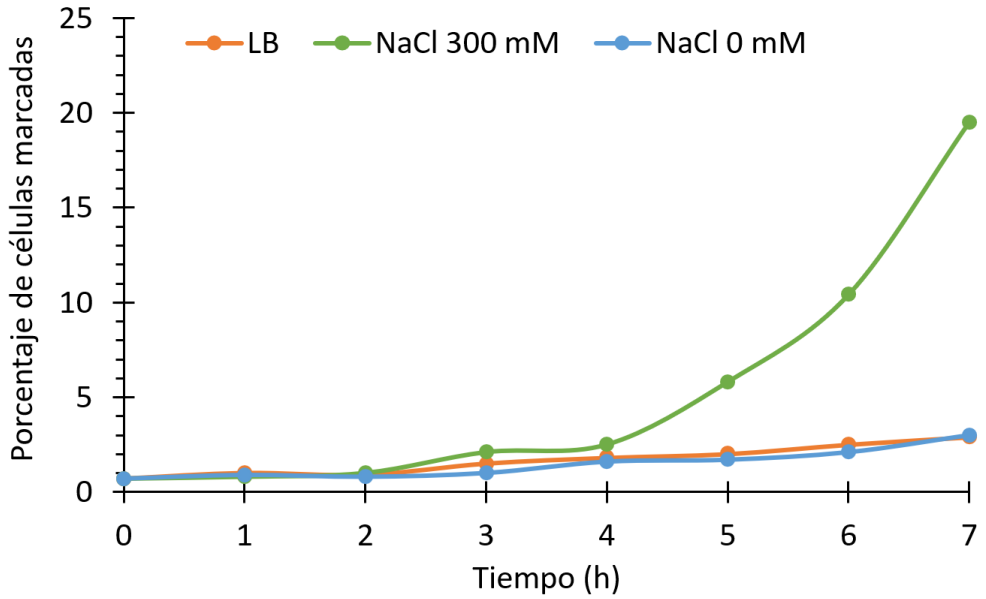


Figura 13. La alta osmolaridad favorece la internalización de OMVs de *S.* Typhi. Cinética de internalización de OMVs marcadas con DiO obtenidas desde condiciones de cultivo estándar (LB), alta osmolaridad (NaCl 300 mM) y sin NaCl (NaCl 0 mM). Se midió un total de 2×10^5 células en cada punto. Los umbrales y detalles de la determinación por citometría de flujo se encuentran en anexo. Representativo n = 2 NaCl 300 mM **y** NaCl 0 mM. LB n = 1.

C) Determinar la entrega de factores de virulencia en células epiteliales a través de OMVs de *S*. Typhi en condiciones de cultivo con alta osmolaridad.

5.10. Detección de efectores en bacterias en condiciones no desnaturantes.

Las OMVs destacan por su capacidad de entrega de factores de virulencia a células eucariontes. Además, propiedades de OMV pueden ser modificadas dependiendo de las condiciones en las que se cultiva la bacteria (Orench-Rivera & Kuehn, 2016). Por estas razones, nos preguntamos si OMVs de *S.* Typhi son capaces de entregar factores de virulencia, como SipB y SipC, a células epiteliales y si la alta osmolaridad como una condición de cultivo que responde a parte del contexto biológico de *Salmonella* favorece la entrega de efectores en células epiteliales respecto condiciones estándar de laboratorio. Para responder esta pregunta proponemos como estrategia experimental incubar OMVs de *S.* Typhi en células epiteliales y detectar efectores por inmunofluorescencia. En este contexto, a diferencia de la técnica de *Western Blot*, en inmunofluorescencia la detección de antígenos ocurre en condiciones no desnaturantes. Por lo tanto, las proteínas mantienen su estructura tridimensional, lo puede dificultar la accesibilidad de los anticuerpos a los epítopos a los cuales se unen. Por este motivo, antes de responder la pregunta de trabajo con la estrategia experimental propuesta, primero realizamos inmunofluorescencia en bacterias crecidas en condiciones de cultivo con alta osmolaridad para promover la expresión de SipB y SipC, para luego probar la detección de efectores en condiciones no desnaturantes. Luego, las bacterias fijadas, además de ser tratadas con el anticuerpo primario de ratón anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich) fueron marcadas con Hoechst 33342. Como resultado, encontramos que es posible inmunodetectar SipB y SipC en condiciones no desnaturantes en bacterias cuando el epítopo 3×FLAG está insertado en el extremo carboxilo de las regiones codificantes de *sipB* y *sipC* (Figura 14). Vale mencionar que en este experimento no se realizó control positivo y control

negativo, sin embargo, para el experimento de inmunofluorescencia en células, que es el experimento realmente importante que responde nuestras preguntas, sí existen estos controles. Por lo tanto, considerando este resultado, decidimos continuar con la estrategia experimental propuesta y detectar efectores entregados por OMVs de *S.* Typhi a células epiteliales mediante inmunofluorescencia.

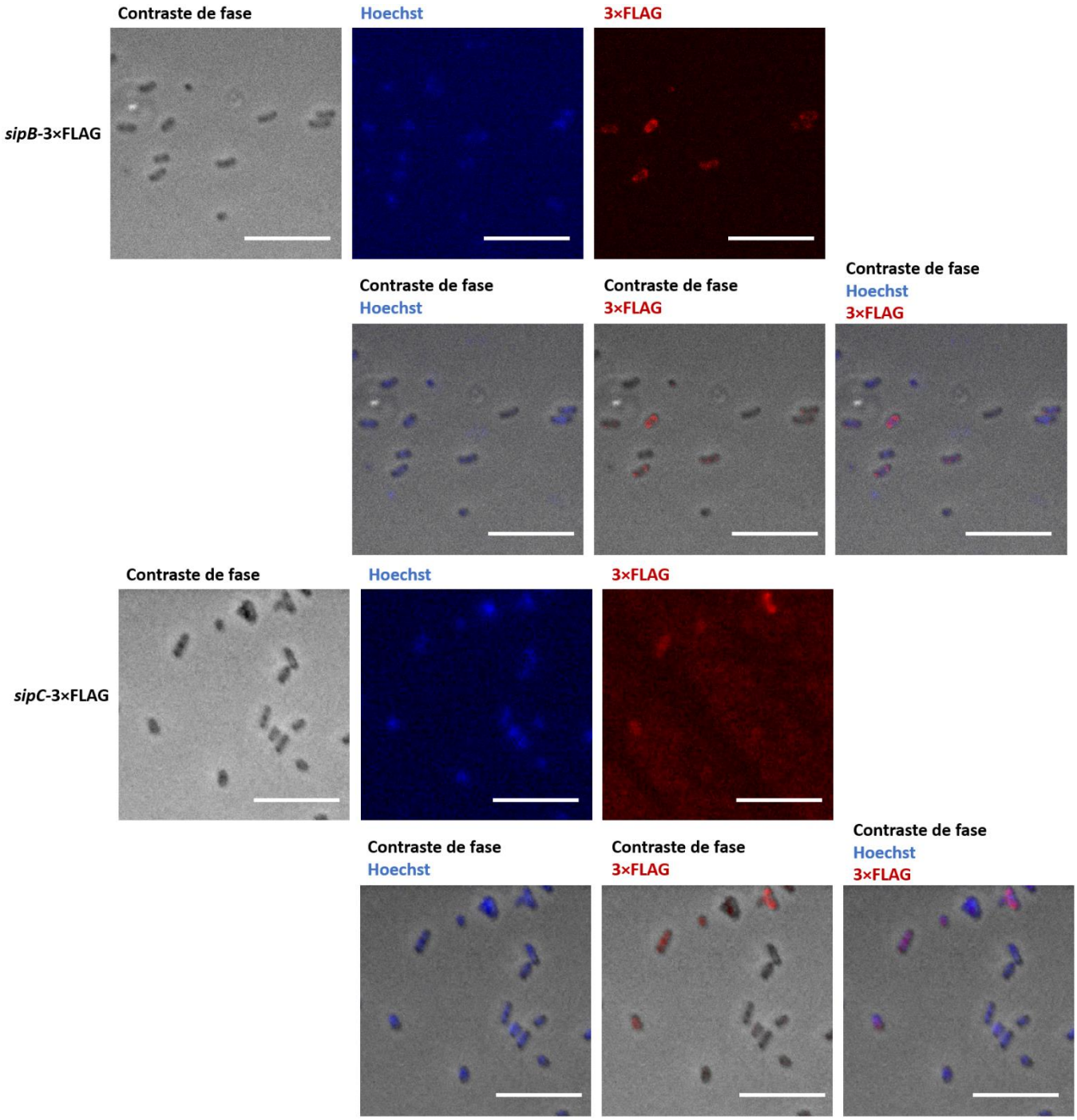


Figura 14. Detección de efectores en bacterias en condiciones no desnaturantes (página anterior). Inmunofluorescencia de bacterias de *S.* Typhi *sipB*-3×FLAG y *S.* Typhi *sipC*-3×FLAG crecidas en condición de cultivo con alta osmolaridad (NaCl 300 mM). Las bacterias fijadas fueron tratadas con el anticuerpo primario de ratón anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich), posteriormente con el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón acoplado al fluoróforo Alexa 594 y Hoechst 33342. La barra blanca indica 20 μm. (n = 1).

5.11. La alta osmolaridad favorece la entrega de SipC a través de OMVs de *S.* Typhi.

Las OMVs destacan por su capacidad de entrega de factores de virulencia (Bielaszewska et al., 2017). Nos preguntamos si OMVs de *S.* Typhi son capaces de entregar factores de virulencia a células epiteliales y si es que la alta osmolaridad favorece la entrega. Para esto realizamos un ensayo de inmunofluorescencia en el que se incubaron por 2 h. OMVs que poseen SipB-3×FLAG o SipC-3×FLAG previamente teñidas con DiO 1% v/v, obtenidas desde condición de cultivo con alta osmolaridad o condición estándar de laboratorio. Como control positivo de detección del epítopo 3×FLAG realizamos una infección con la cepa *S.* Typhi SipC-3×FLAG durante 1 h. Como control negativo de la detección del epítopo 3×FLAG realizamos una infección con la cepa silvestre de *S.* Typhi (Figura 15). En la Figura 16 y Figura 17, las 3 imágenes superiores son imágenes completas de células marcadas con Hoechst 33342 y faloidina, tratadas con OMVs que portan SipC-3×FLAG marcadas con DiO, obtenidas desde condición de cultivo con alta osmolaridad y cultivo estándar, respectivamente. Luego, las 3 imágenes inferiores tienen aumento artificial de 3× de las imágenes completas. Como resultado, encontramos que las OMVs obtenidas desde condición de cultivo con alta osmolaridad son capaces de entregar SipC-3×FLAG a células epiteliales. La marca de OMVs (en color rojo), se encontró en la periferia de las células y también dentro de las células epiteliales. Interesantemente, la marca de SipC-3×FLAG (en color verde), siempre se observó por la periferia de las células epiteliales (Figura 16). Por otra parte, en condiciones de cultivo estándar, encontramos marca de OMVs en la periferia y también dentro de las células. Sin embargo, no encontramos marca de SipC-

3×FLAG en células tratadas con OMVs obtenidas desde condición de cultivo estándar (Figura 17). Tampoco encontramos entrega de SipB-3×FLAG por OMVs obtenidas desde condición de cultivo con alta osmolaridad ni condición de cultivo estándar (los datos no se muestran).

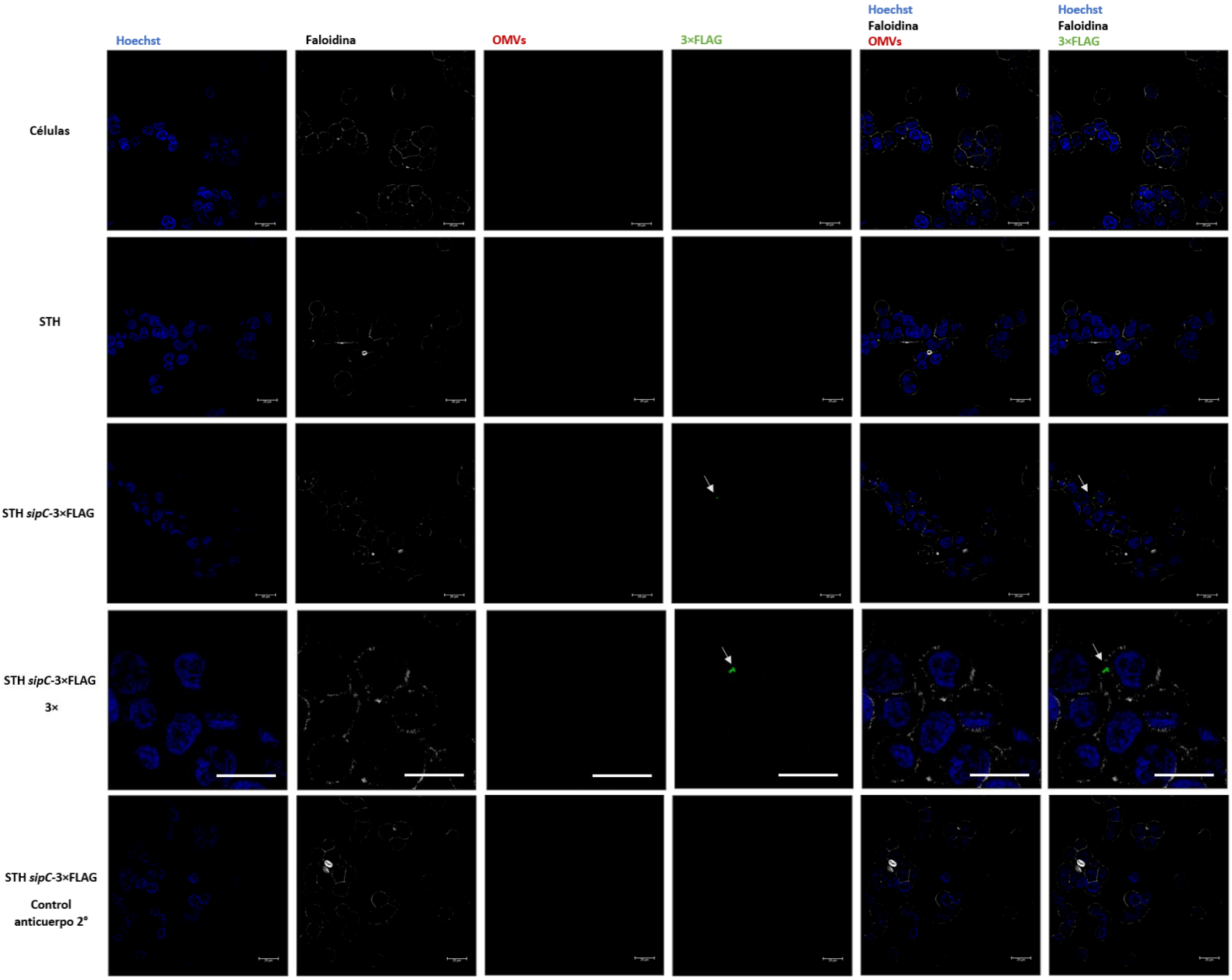


Figura 15. La alta osmolaridad favorece la entrega de SipC a través de OMVs de *S.* Typhi (controles inmunofluorescencia). Células HT-29 fueron infectadas por 1 h. con *S.* Typhi silvestre (STH) o *S.* Typhi *sipC*-3×FLAG (STH *sipC*-3×FLAG). Control anticuerpo secundario posee anticuerpo 2° pero no 1°, y células indica control sin infección. Las células fijadas fueron tratadas con el anticuerpo primario de ratón anti-FLAG M2, posteriormente con el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado al fluoróforo Alexa 594, Hoechst 33342 y faloidina-iFluor 647 El mismo tratamiento aplica para las inmunofluorescencias de la Figura 16 y Figura 17. Faloidina, **OMVs** y **3×FLAG** se muestran con colores artificiales. Las flechas indican **3×FLAG** y las puntas de flecha indican **OMVs**. La barra blanca indica 20 μm. Las imágenes en el microscopio confocal se tomaron con un objetivo de 60×. (n = 2).

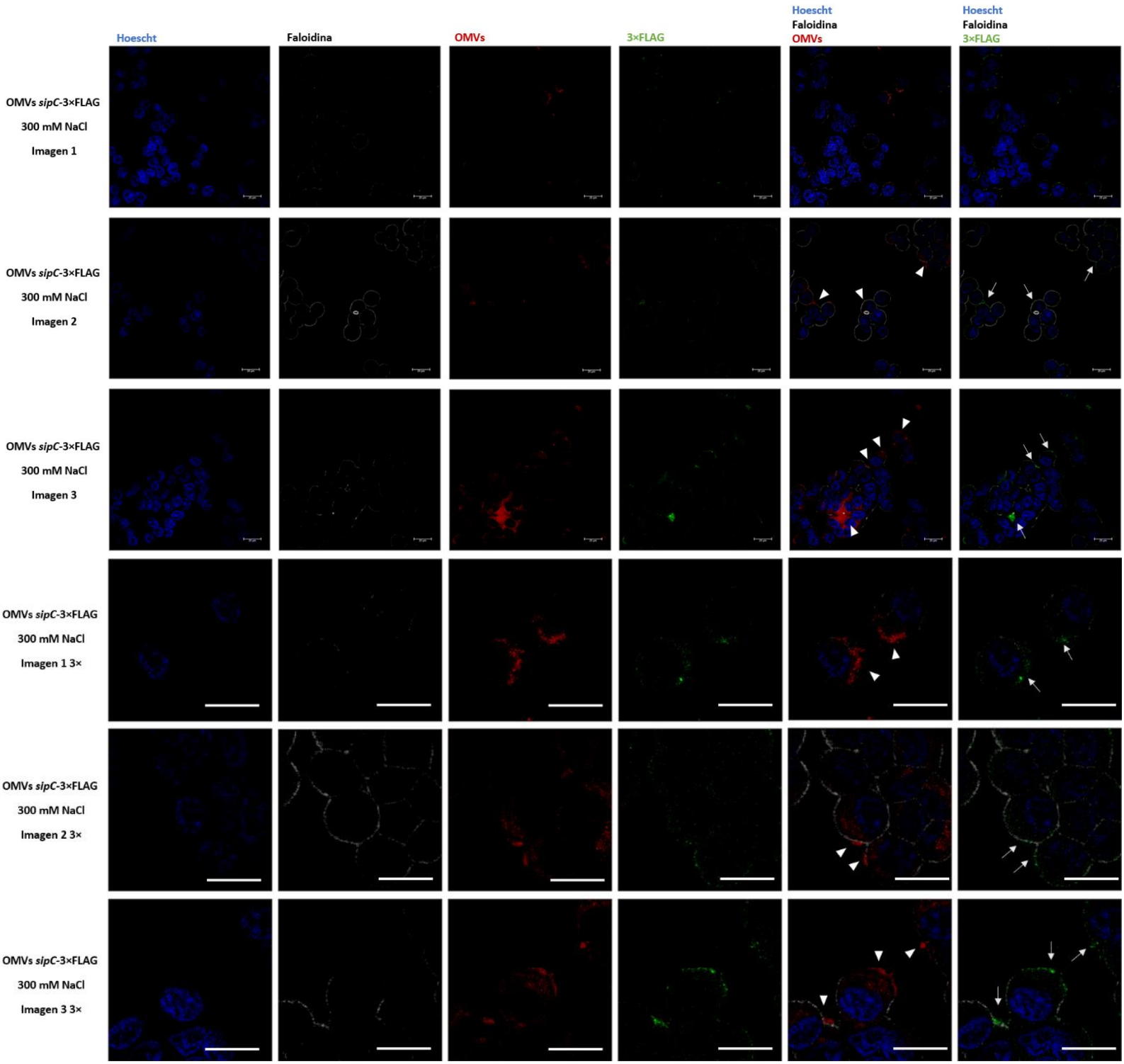


Figura 16. La alta osmolaridad favorece la entrega de SipC a través de OMVs de *S.* Typhi (OMVs NaCl 300 mM). Células HT-29 fueron incubadas por 2 h. con OMVs que poseen SipC-3×FLAG previamente teñidas con DiO 1% v/v, obtenidas desde condición de cultivo con alta osmolaridad. Faloidina, **OMVs** y **3×FLAG** se muestran con colores artificiales. Las flechas indican **3×FLAG** y las puntas de flecha indican **OMVs**. La barra blanca indica 20 μm. Las imágenes en el microscopio confocal se tomaron con un objetivo de 60×. (n = 2).

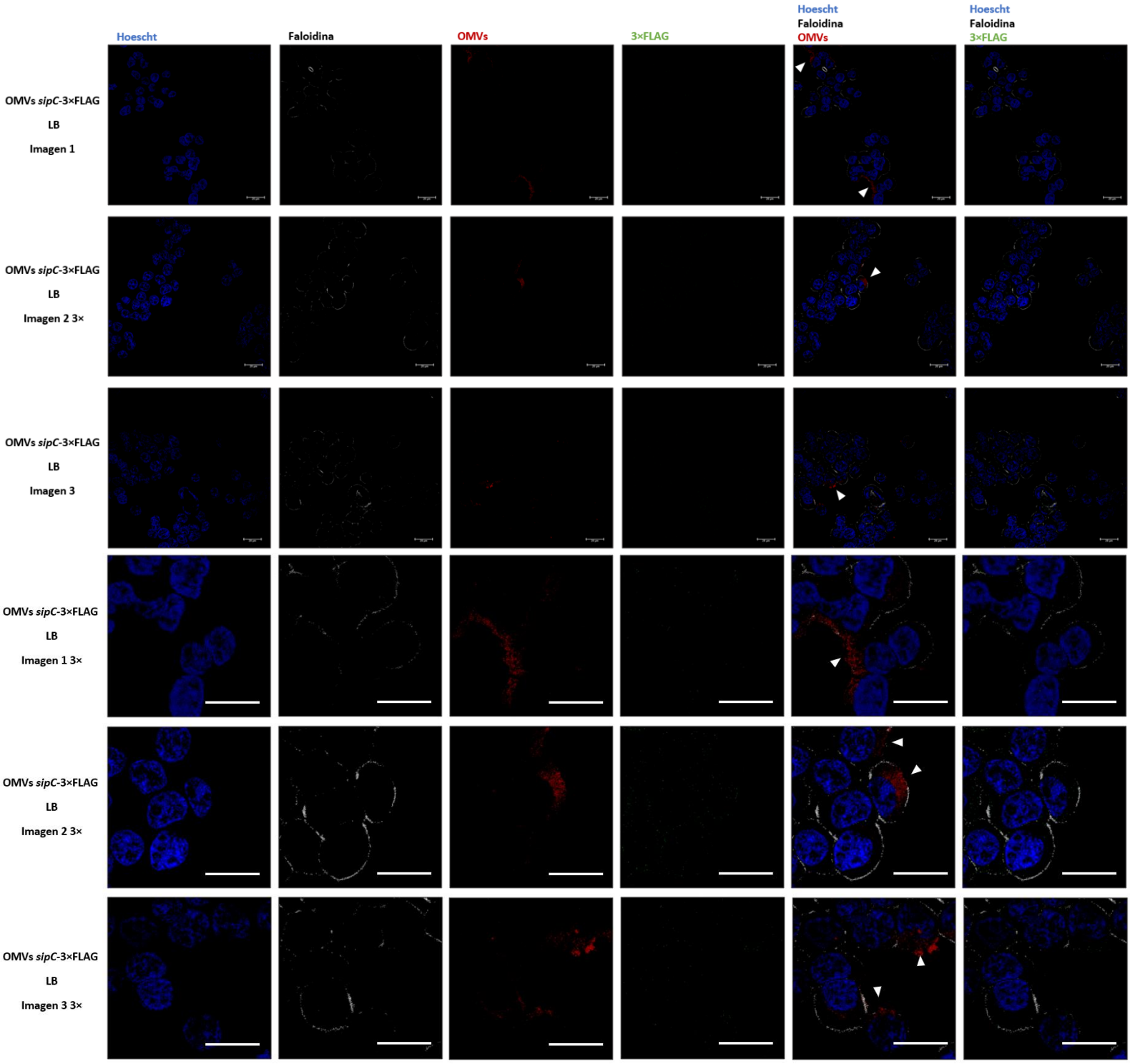


Figura 17. La alta osmolaridad favorece la entrega de SipC a través de OMVs de *S.* Typhi (OMVs LB). Células HT-29 fueron incubadas por 2 h. con OMVs que poseen SipC-3×FLAG previamente teñidas con DiO 1% v/v, obtenidas desde condición de cultivo estándar de laboratorio. Faloidina, **OMVs** y **3×FLAG** se muestran con colores artificiales. Las flechas indican **3×FLAG** y las puntas de flecha indican **OMVs**. La barra blanca indica 20 µm. Las imágenes en el microscopio confocal se tomaron con un objetivo de 60×. (n = 2).

Como se muestra en la Figura 16, nos pareció interesante que la marca de SipC-3×FLAG se encontró en la periferia de las células epiteliales, mientras que las OMVs se observaron en la periferia celular, pero también dentro de ellas. Por este motivo, analizamos el plano ortogonal de imágenes de microscopía confocal (Figura 18). No encontramos colocalización de OMVs y SipC-3×FLAG, sin embargo, encontramos que SipC-3×FLAG entregado por OMVs se encuentra en la periferia celular, mientras que las OMVs se observan hacia el interior de la célula epitelial, lo que aparenta ser entrega de cargamento por OMVs.

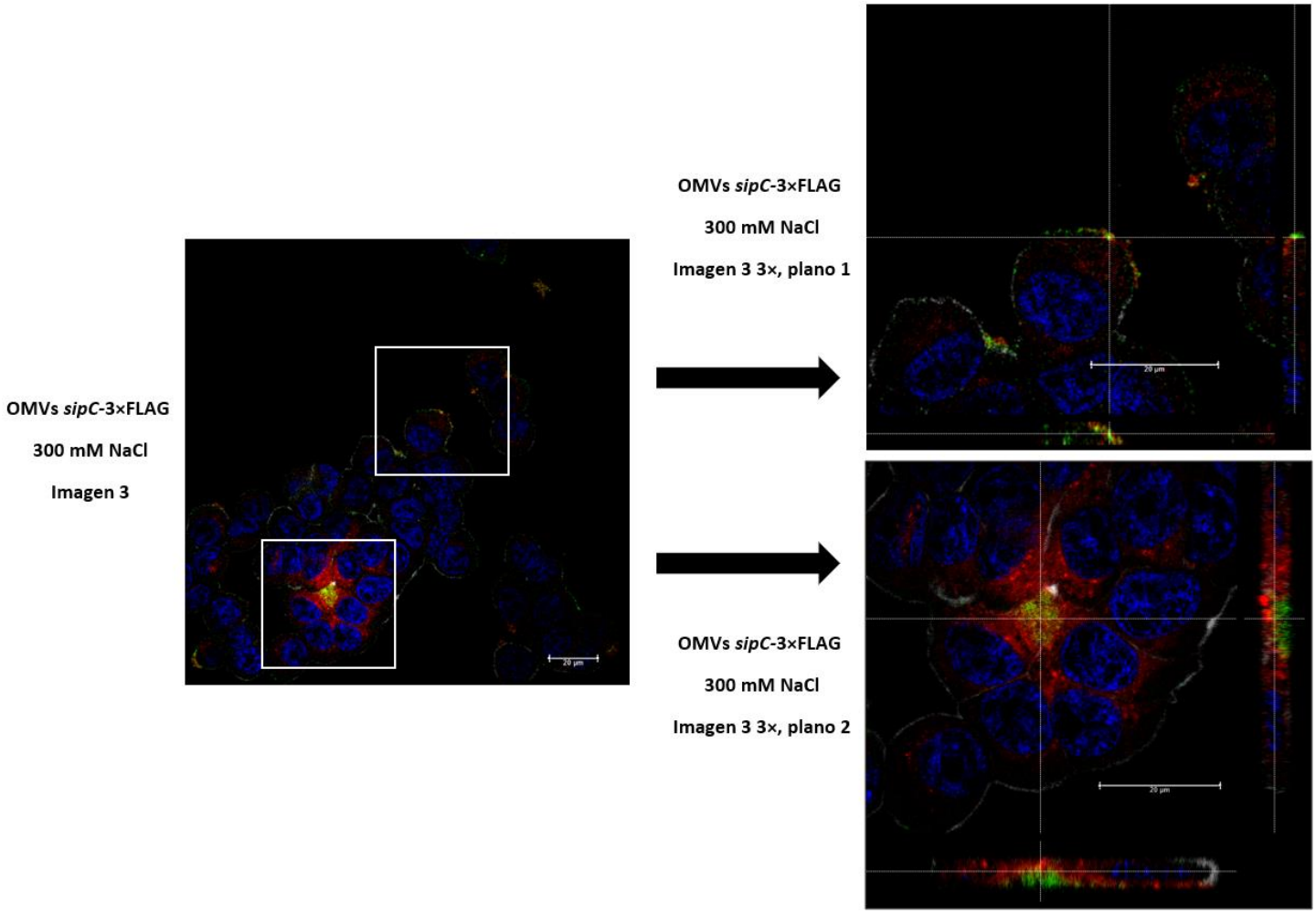


Figura 18. SipC entregado por OMVs se encuentra en la periferia celular. Células HT-29 fueron incubadas por 2 h. con OMVs que poseen SipC-3×FLAG previamente teñidas con DiO 1% v/v, obtenidas desde condición de cultivo con alta osmolaridad. La imagen de la izquierda es una imagen completa obtenida desde el microscopio confocal con un objetivo de 60×. La imagen superior tiene un aumento artificial de 3×. La imagen inferior tiene un aumento digital de 3× obtenido desde el microscopio confocal. Ambas imágenes con plano ortogonal tienen Z-Stack = 34. La barra blanca indica 20 μm.

5.12. Construcción de fusiones reporteras con *bla.*

Cuando diseñamos este proyecto de tesis, éramos conscientes de los inconvenientes de la técnica de inmunofluorescencia. Uno de ellos, es la sensibilidad del ensayo. Considerábamos que la sensibilidad de la inmunofluorescencia podía no ser suficiente para la detección de efectores entregados por OMVs. Sin embargo, fuimos capaces de detectar entrega de SipC-3×FLAG a través de OMVs obtenidas desde condición de cultivo con alta osmolaridad. Creemos que SipB-3×FLAG también es entregado por OMVs a células epiteliales, pero en menor cantidad respecto SipC-3×FLAG. Por otra parte, se han desarrollado sistemas reporteros para estudiar entrega de proteínas a células eucariontes basados en reacciones enzimáticas que tienen una alta sensibilidad y potencian la señal (Zlokarnik, 2000; Zlokarnik et al., 1998). Por esta razón, como técnica alternativa a la inmunofluorescencia, para estudiar entrega de proteínas a través de OMVs utilizamos el sistema reportero basado en actividad β-lactamasa, el cual se ha utilizado para estudiar entrega de proteínas a células epiteliales a través de OMVs (Kim et al., 2018). Brevemente, el sistema reportero funciona de la siguiente manera: CCF4-AM es una molécula compuesta por dos fluoróforos; hidroxicumarina y fluoresceína, los cuales se encuentran unidos por un anillo β-lactámico. La forma esterificada de (acetoximetilada: AM) es una molécula lipofílica que rápidamente entra a las células eucariontes. Las esterasas moleculares modifican la molécula, y CCF4 puede ser detectado por fluorescencia dentro de las células. La molécula completa emite fluorescencia en color verde, sin embargo, producto de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET), en presencia de β-lactamasa cambia la emisión de fluorescencia a color azul (Zlokarnik, 2000; Zlokarnik et al., 1998). Por este motivo, se han desarrollado fusiones genéticas con β-lactamasa para estudiar entrega de proteínas a células eucariontes.

Para esto, fue necesario construir fusiones genéticas de las regiones codificantes de *sipB* y *sipC* con la región codificante de β-lactamasa, *bla* (excluyendo el péptido señal). Las fusiones genéticas se clonaron río abajo del promotor arabinosa (P_{araBAD}) en el plásmido pBAD33.1 que posee resistencia a cloranfenicol. Para facilitar la selección de clones positivos se incluyó resistencia a kanamicina río abajo de las fusiones *sipB-bla* o *sipC-bla*, donde la resistencia a kanamicina incluye un promotor y terminador de transcripción independiente de la fusión genética (plásmidos diseñados *in silico* se encuentran en la (Figura 19).Para comprobar la construcción de plásmidos con fusiones genéticas, las bacterias transformantes resistentes a cloranfenicol y kanamicina (Cam^R, Kan^R) fueron aisladas y se les purificó plásmidos. Para revisar los tamaños de los plásmidos y si estos poseían insertos candidatos, los plásmidos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa para confirmar la inserción de DNA y también se realizó PCR utilizando un partidor externo y un partidor interno a la inserción de DNA. Los partidores utilizados son F pBAD (interno) y R kan (externo). La región de alineamiento de los partidores se encuentra graficada en la Figura 19 y la secuencia de los partidores se encuentra en la Tabla 3, anexo. Como resultado, al revisar por tamaño encontramos que todos los plásmidos purificados poseen insertos, al comparar con pBAD33.1 (Figura 20 A). Los tamaños de insertos esperados en pBAD33.1::*sipB-bla* y pBAD33.1::*sipC-bla* son de 4110 y 3558 pb, respectivamente. Encontramos que el clon 2 de pBAD33.1::*sipB-bla* y el clon 6 de pBAD33.1::*sipC-bla* poseen los tamaños esperados (Figura 20 B).

Decidimos revisar detalladamente estos clones candidatos (clon 2 de pBAD33.1::*sipB-bla* y clon 6 de pBAD33.1::*sipC-bla*) . Para esto, realizamos reacciones de PCR con distintas combinaciones de partidores para comprobar: 1) Que posean *sipB* o *sipC*, según corresponda. 2) Que posean *bla*. 3) Que posean fusiones *sipB-bla* o *sipC-bla*, según

corresponda. 4) Que las fusiones estén clonadas río abajo del promotor arabinosa. Los amplicones esperados en pares de bases para pBAD33.1::*sipB-bla* y pBAD33.1::*sipC-bla* utilizando las combinaciones de partidores recién mencionadas, respectivamente son: 1) 1859 y 1300, 2) 864 y 864, 3) 2646 y 2094, 4) 2721 y 2169. Como resultado, encontramos una correcta construcción de los plásmidos pBAD33.1::*sipB-bla* y pBAD33.1::*sipC-bla* debido a que los amplicones obtenidos son del tamaño esperado (Figura 21).

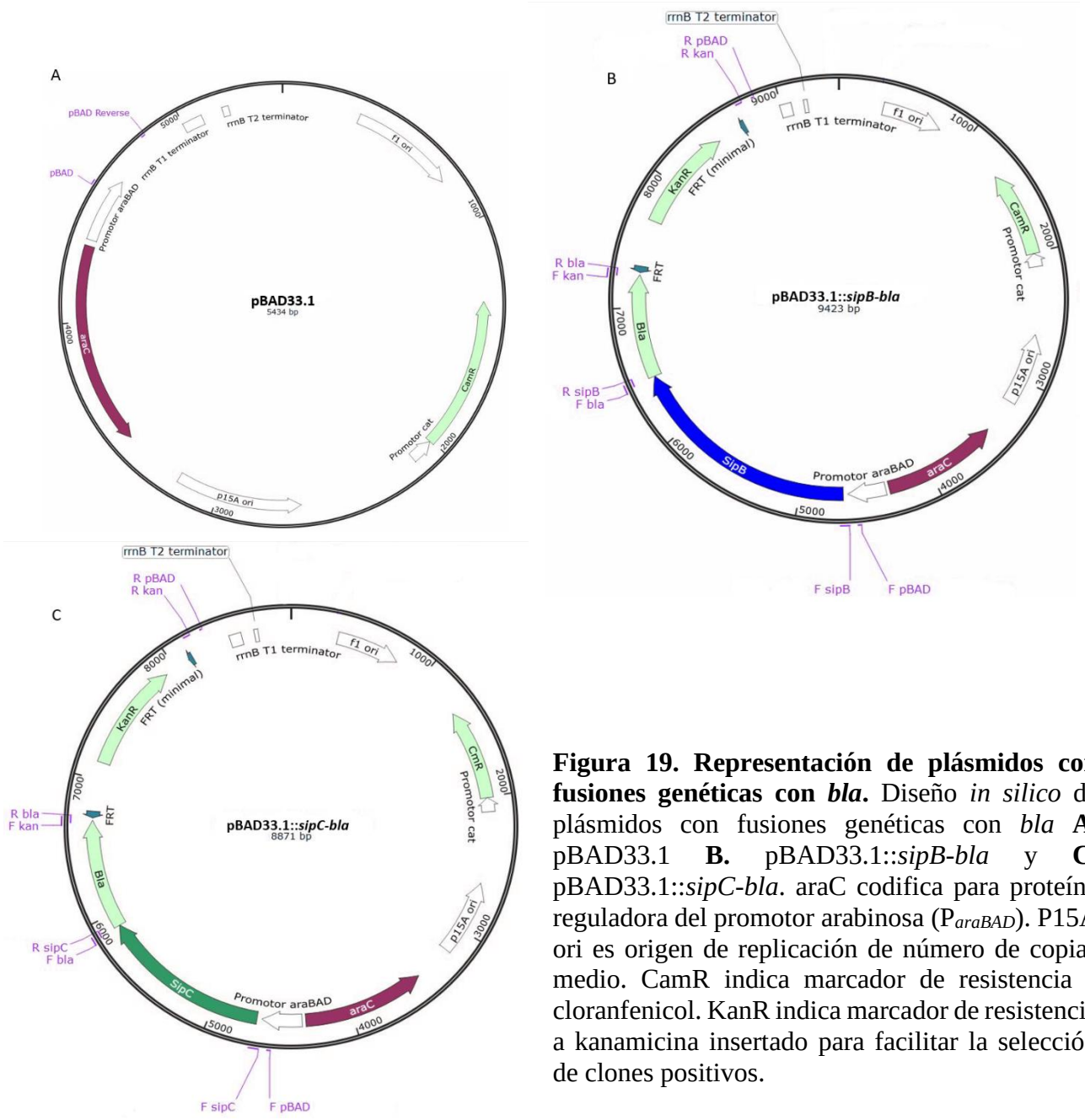


Figura 19. Representación de plásmidos con fusiones genéticas con *bla*. Diseño *in silico* de plásmidos con fusiones genéticas con *bla* **A.** pBAD33.1 **B.** pBAD33.1::*sipB-bla* y **C.** pBAD33.1::*sipC-bla*. araC codifica para proteína reguladora del promotor arabinosa (P_{araBAD}). P15A ori es origen de replicación de número de copias medio. CamR indica marcador de resistencia a cloranfenicol. KanR indica marcador de resistencia a kanamicina insertado para facilitar la selección de clones positivos.

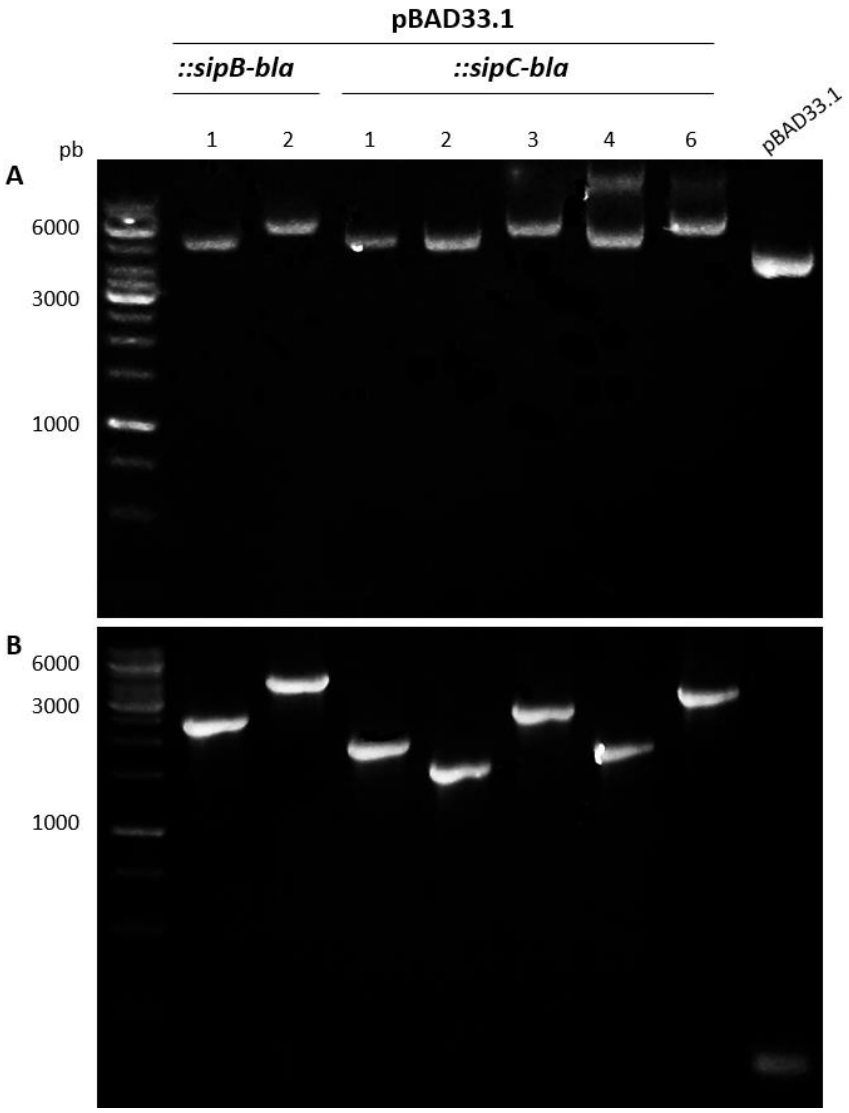


Figura 20. *Screening* construcción de plásmidos con fusiones con *bla*. A. Electroforesis en gel de agarosa 1% de plásmidos purificados desde bacterias transformantes resistentes a los marcadores de selección (Cam^R, Kan^R). **B.** PCR comprobatorio utilizando como templados plásmidos purificados desde bacterias transformantes resistentes a los marcadores de selección (Cam^R, Kan^R), utilizando los partidores F pBAD (partidor externo a la secuencia de DNA clonada) y R kan + pBAD33.1 (partidor interno a la secuencia de DNA clonada). La secuencia de los partidores utilizados se indica en Tabla 2; anexo. El estándar utilizado es *GeneRuler^{TM} 1 kb DNA Ladder* (Invitrogen).

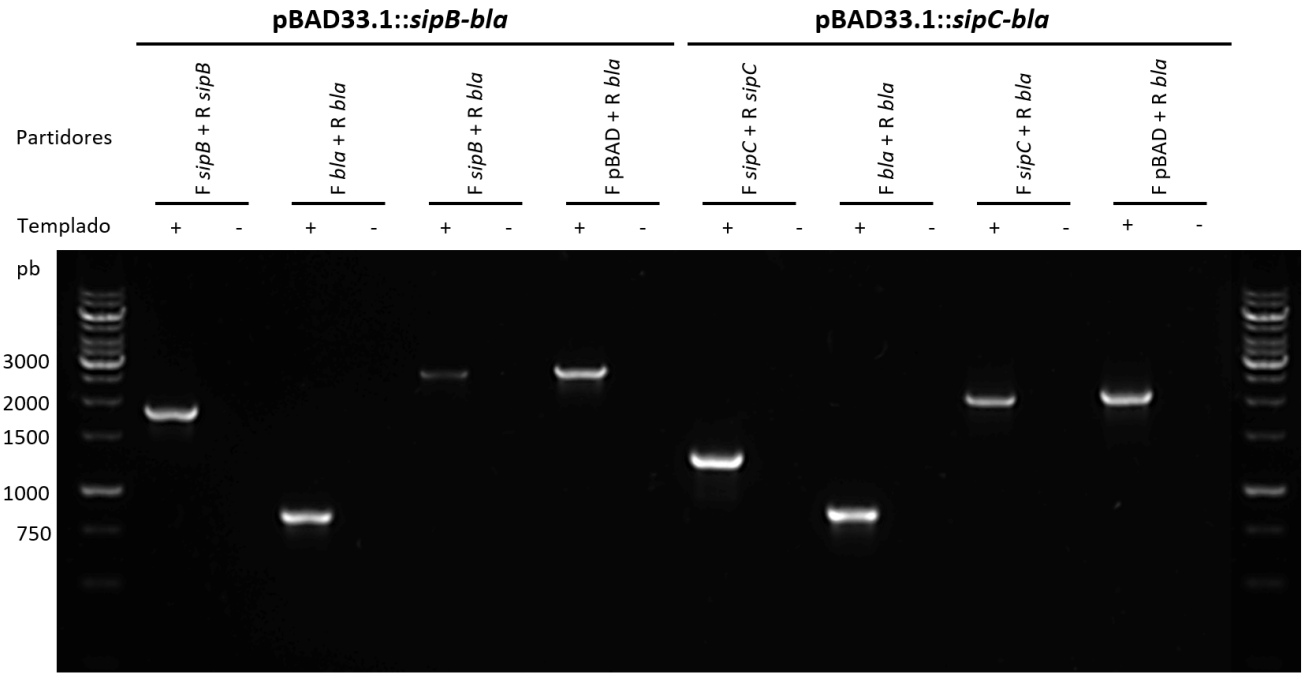


Figura 21. Comprobación fusiones con *bla* y clonación. PCR comprobatorio de la construcción de plásmidos con fusiones *bla* utilizando como templado los plásmidos pBAD33.1::*sipB-bla* o pBAD33.1::*sipC-bla* y distintas combinaciones de partidores para comprobar la clonación y fusión con *bla*.

5.13. Construcción de fusiones reporteras con *bla*: Secuenciación.

Por último, para terminar de revisar las fusiones genéticas, decidimos secuenciar las regiones críticas. Definimos como regiones críticas de las fusiones genéticas: 1) El extremo 5' de *sipB-bla* o *sipC-bla,* para comprobar que estén clonadas bajo el promotor arabinosa del plásmido pBAD33.1. 2) La región de fusión entre *sipB-bla* o *sipC-bla,* para comprobar que las fusiones estén en marco de lectura. Como resultado encontramos que *sipB-bla* y *sipC-bla* están clonadas bajo el promotor arabinosa y que la fusión de *sipB-bla* está en marco de lectura. Además, las fusiones genéticas al menos en las regiones críticas no poseen cambios de nucleótido ni *gaps* (Figura 22). Vale mencionar, que no se incluye la secuenciación de la región de fusión entre *sipC-bla* por problemas en la cuantificación para la secuenciación de la muestra.

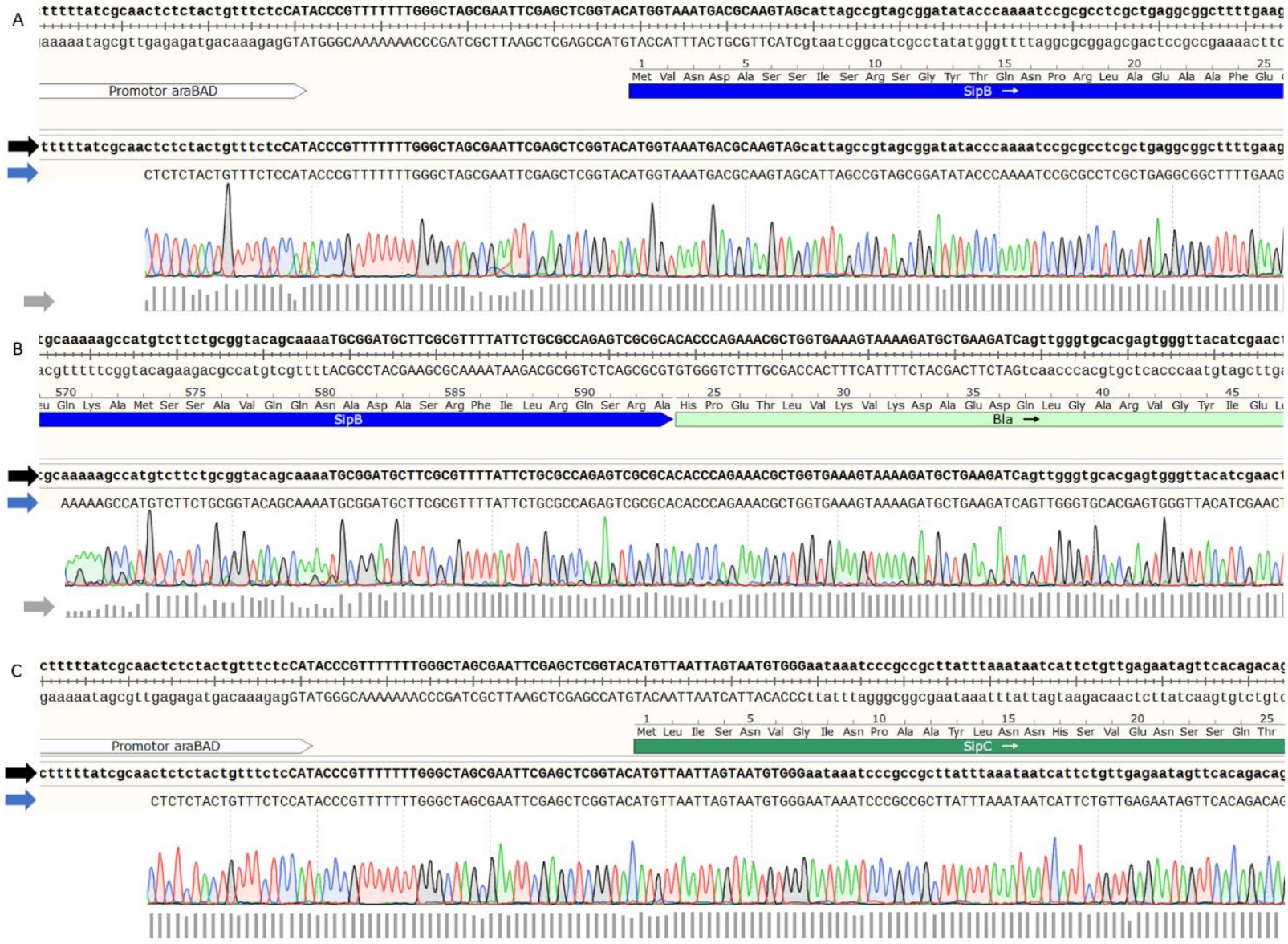

A
Promotor araBAD
SipB
B
SipB
Bla
C
Promotor araBAD
SipC

Figura 22. Alineamiento de regiones críticas de fusiones con *bla* (página anterior). Se secuenciaron las regiones críticas de los constructos *sipB-bla* o *sipC-bla* y se alinearon contra los plásmidos pBAD33.1::*sipB-bla* (**A.** y **B.**) o pBAD33.1::*sipC-bla* (**C.**) diseñados *in silico.* Las regiones críticas **A.** y **C.** corresponden a el extremo 5' de *sipB-bla* o *sipC-bla*, respectivamente, para comprobar que estén clonadas bajo el promotor arabinosa del plásmido pBAD33.1. **B.** Corresponde a la región de fusión entre *sipB-bla*, para comprobar que la fusión esté en marco de lectura. No se incluye la secuenciación de la región de fusión entre *sipC-bla* por problemas en la cuantificación para la secuenciación de la muestra. Con flecha negra se indica la secuencia molde de los plásmidos diseñados *in silico* y con flecha azul las secuencias obtenidas luego de la secuenciación. Con flecha gris se indica la calidad de la secuenciación a lo largo del fragmento.

5.14. Ensayo de actividad β-lactamasa como reportero.

Con las fusiones genéticas *sipB-bla* y *sipC-bla* construidas y chequeadas, es posible realizar ensayos de actividad β-lactamasa como reportero para estudiar entrega de SipB y SipC por OMVs a células epiteliales. Para esto, considerando los datos de cinética de internalización, donde encontramos que a partir de las 3 horas incrementa la internalización de OMVs, obtuvimos OMVs de bacterias portadoras de pBAD33.1::*sipB-bla* o pBAD33.1::*sipC-bla* inducidas con L-Arabinosa e incubamos 30 µg de OMVs por 4 horas en 5×10^4 células HT-29. Luego, el ensayo con CCF4-AM se realizó según las indicaciones del fabricante. Como control positivo, utilizamos OMVs de la cepa Δ*degS* $attB_{Gifsy\text{-}1}$::pNFB9 que carga β-lactamasa en OMVs (Nevermann et al., 2019) y como control negativo OMVs de la cepa silvestre (WT). Vale mencionar que, en este ensayo, solo utilizamos OMVs obtenidas desde condiciones estándar de cultivo (LB). Luego, para analizar los datos, graficamos la relación de fluorescencia azul/verde, tal como se ha reportado (Aguilera & Sun, 2021). Donde la fluorescencia azul indica presencia de β-lactamasa. Como resultado, encontramos que la relación de fluorescencia azul/verde en OMVs obtenidas de *S.* Typhi portando pBAD33.1::*sipB-bla* o pBAD33.1::*sipC-bla* es similar al control positivo de la cepa *S.* Typhi Δ*degS* $att_{Gifsy\text{-}1}$::pNFB9, a diferencia de la cepa silvestre (WT) utilizada como

control negativo, donde la relación de fluorescencia azul/verde es mucho más baja respecto el control positivo (Figura 23). Por lo tanto, encontramos que OMVs de *S.* Typhi entregan SipB y SipC a células epiteliales.

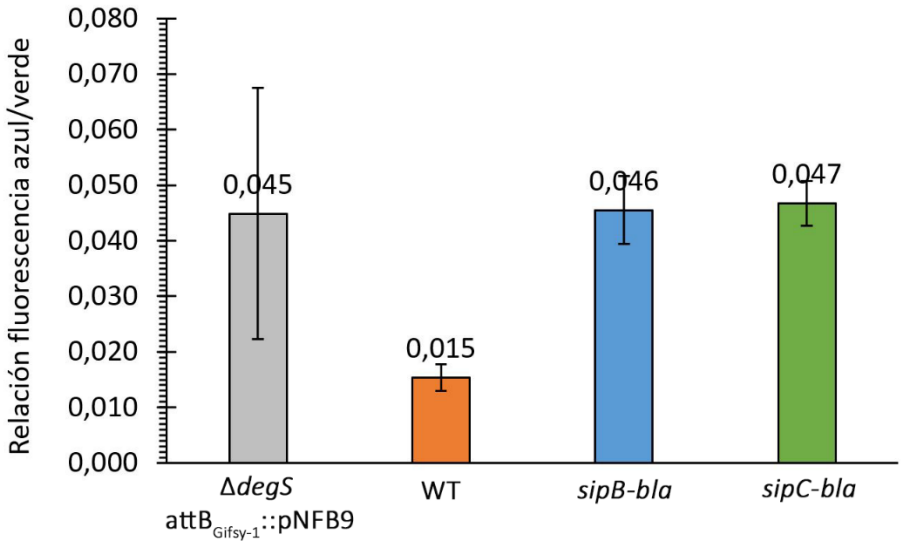


Figura 23. Ensayo de actividad β-lactamasa como reportero. OMVs de *S.* Typhi Δ*degS* $att_{Gifsy-1}$::pNFB9 (control positivo), *S.* Typhi silvestre (WT, control negativo) y *S.* Typhi portando pBAD33.1::*sipB-bla* (*sipB-bla*) o pBAD33.1::*sipC-bla* (*sipC-bla*) obtenidas desde condiciones de cultivo estándar (LB) se incubaron durante 4 h con 5×10^4 células HT-29 por pocillo. En cada pocillo se cargó 30 µg de OMVs cuantificas por proteínas. Cada muestra tiene una réplica técnica = 3. (n = 1).

6. DISCUSIÓN

En este trabajo pudimos evaluar el efecto de la alta osmolaridad sobre OMVs de *S.* Typhi. A nuestro conocimiento, hasta la fecha no se ha reportado el efecto de la alta osmolaridad sobre OMVs de *Salmonella*, por lo que una de las novedades de nuestro trabajo es el estudio del efecto de la alta osmolaridad sobre OMVs de *S.* Typhi. De esta manera, encontramos que la alta osmolaridad favorece la liberación de OMVs, cambia el contenido proteico de OMVs, aumenta la carga de SipC en OMVs, favorece la internalización de OMVs en células epiteliales y también favorece la entrega de SipC en células epiteliales a través de OMVs.

La liberación de OMVs ocurre durante el crecimiento normal de bacterias Gram negativo; sin embargo, agentes estresores pueden aumentar la liberación de OMVs. Las condiciones ambientales presentes en el hospedero pueden considerarse agentes estresores que podrían aumentar la liberación de OMVs y modular algunas propiedades de OMVs. En este trabajo, encontramos que la alta osmolaridad aumenta el contenido de proteínas y lípidos en OMVs de *S.* Typhi, lo que se ha relacionado previamente con un aumento en la producción de OMVs (Deatherage et al., 2009; Schwechheimer & Kuehn, 2015). Además, encontramos que la alta osmolaridad también cambia el perfil de proteínas en OMVs de *S.* Typhi y aumenta la carga de SipC en OMVs. Efectos similares se han descrito en otras bacterias Gram negativo. Por ejemplo, la producción de OMVs de *Campylobacter jejuni* aumenta en condiciones de cultivo en presencia de bilis. En el trabajo de (Taheri et al., 2018) se demostró que a bajas concentraciones de bilis, la producción de OMVs no varía, sin embargo, a medida que aumenta la concentración de bilis en el medio de cultivo también aumenta la producción de OMVs. Además, la bilis modula el cargamento en OMVs de *Campylobacter jejuni*. De manera similar, en condiciones de cultivo que imitan el ambiente intracelular de macrófagos

(pH ácido y condiciones limitantes de Mg^{2+}), la producción de OMVs de *S.* Typhimurium se encuentra aumentada (Bonnington Katherine & Kuehn Meta, 2016). También, se ha reportado que en condiciones de cultivo que imitan el ambiente intracelular de macrófagos las OMVs de *S.* Typhimurium cargan proteínas asociadas a supervivencia en macrófagos (Bai et al., 2014), lo que sugiere que existe una selección del cargamento en OMVs según las señales ambientales en las que crece la bacteria.

En este trabajo encontramos mediante *Western Blot* que SipC está presente en OMVs y que la alta osmolaridad aumenta la carga de SipC en OMVs de *S.* Typhi. Las proteínas efectoras asociadas al TTSSIII, son translocadas por el inyectisoma al citoplasma de la célula hospedera para, de manera general, modular funciones celulares y favorecer la internalización de *Salmonella* en la célula hospedera. En el caso de SipC, que forma parte del translocón del TTSSIII, existe evidencia genética que indica que se secreta por el inyectisoma hacia el medio extracelular (Kubori et al., 2000) y que además, la alta osmolaridad aumenta la secreción de SipC al medio extracelular (Arricau et al., 1998). Debido a que SipC puede interactuar con membranas (Myeni et al., 2013) creemos que SipC se secreta por el inyectisoma hacia el medio extracelular y se asocia con OMVs tras su biogénesis. Lo que puede explicar el aumento en la carga de SipC en OMVs obtenidas desde condiciones de cultivo con alta osmolaridad, respecto condiciones de cultivo estándar. Respecto a SipB, a pesar de que al igual que SipC, la alta osmolaridad aumenta su secreción hacia el medio extracelular por el inyectisoma, no detectamos SipB en OMVs de *S.* Typhi mediante *Western Blot*. Esto puede deberse a que la abundancia de SipB en OMVs es muy baja, lo que se condice con los datos de nuestro laboratorio de análisis proteómico de OMVs en condiciones de cultivo estándar, donde SipB tiene una baja abundancia, mientras que por otra parte SipC se encuentra entre las 10 proteínas más abundantes en OMVs de *S.* Typhi en

condiciones de cultivo estándar. Sin embargo, es interesante que tampoco es posible detectar SipB en OMVs obtenidas desde condición de con alta osmolaridad, donde se esperaría que la abundancia de SipB aumente, tal como es el caso de SipC.

En el presente trabajo encontramos que OMVs obtenidas desde condiciones de cultivo con alta osmolaridad tienen una cinética de internalización aumentada. Esto puede deberse a que el estímulo de la alta osmolaridad modifica OMVs de *S.* Typhi, lo que puede modificar la ruta de internalización de OMVs en células epiteliales. Los principales determinantes que definen la ruta endocítica de las OMVs son: 1) El cargamento de proteínas en OMVs. 2) El tamaño de OMVs (O'Donoghue & Krachler, 2016; Turner et al., 2018b). En este sentido, en el presente trabajo demostramos que la alta osmolaridad es una condición que cambia el cargamento proteico de OMVs, por lo que podría ser plausible que la condición de cultivo modifique la ruta de internalización de OMVs. En cuanto al tamaño de OMVs, estamos interesados en medir esta característica para comenzar a entender por qué la alta osmolaridad aumenta la cinética de internalización y si esto afecta en la ruta endocítica de OMVs.

Se ha descrito que luego de la secreción de SipB y SipC al medio extracelular, estos interactúan entre sí para insertarse en la membrana de la célula hospedera y formar el translocón. Mutantes estructurales de SipC que no interactúan con SipB, son defectuosas para unirse a la membrana de la célula hospedera. Adicionalmente, en ausencia de SipB, no es posible detectar SipC en la fracción de membrana ni en el citoplasma celular (Myeni et al., 2013). En nuestro trabajo, encontramos que OMVs de *S.* Typhi en condiciones de cultivo con alta osmolaridad entregan SipC a células epiteliales. Observamos que las OMVs se encuentran en la periferia celular y también dentro de la célula epitelial. Por otra parte, detectamos SipC solo en la periferia de la célula epitelial, lo que posiblemente es la

membrana celular. Para asegurar que SipC entregado por OMVs se encuentra en la membrana celular, es necesario utilizar sondas como WGA que marcan la membrana celular (Pinto da Silva & Kan, 1984). A pesar de ello, este resultado muestra la entrega de SipC por OMVs de *S.* Typhi. No obstante, sería interesante comparar con entrega de efectores por OMVs que tienen su función el citoplasma celular, como SopB o SopE, donde en este caso no esperaríamos encontrar marca en la periferia celular (Johnson, Mylona, et al., 2018). Aun así, basándonos en los antecedentes anteriores, en caso de que las OMVs de *S.* Typhi no carguen SipB, no sería posible detectar SipC en células epiteliales, ya que se necesita de ambas proteínas para que se inserten en la membrana celular (Myeni et al., 2013). Por lo tanto, barajamos dos hipótesis: 1) OMVs de *S.* Typhi cargan SipB en muy bajas cantidades, que no se detectan por *Western Blot* y por ese motivo es posible detectar SipC entregado por OMVs (lo que se condice con nuestros datos de análisis proteómico). 2) OMVs de *S.* Typhi funcionan como vehículo para SipC pero no para SipB, y lo que permite la detección de SipC entregado por OMVs en células HT-29 es una posible entrega por fusión de membrana, posicionando SipC en la periferia celular. Para determinar esto, es necesario realizar ensayos inhibiendo fusión de membrana, por ejemplo, utilizando citocalasina D (O'Donoghue & Krachler, 2016). En relación con la segunda hipótesis, esto también explicar resultados de ensayos funcionales por entrega de OMVs realizados también en este trabajo (Figura 28, anexo). Brevemente, realizamos ensayos de infección con una cepa mutante carente de translocón (Δ*sipBC*), que posee fenotipo no invasivo. Con la idea de complementar la falta de SipB y SipC en la cepa Δ*sipBC,* se trataron células HT-29 con OMVs de la cepa silvestre, esperando que entreguen SipB y SipC, para posicionar el translocón. Luego, se infectó con la cepa Δ*sipBC* y no revirtió el fenotipo no invasivo. Lo que nos hace pensar que no ocurrió reversión de fenotipo porque las OMVs de *S.* Typhi posiblemente funcionen como

mecanismo de entrega solo para SipC. Por este motivo, y considerando los datos de inmunofluorescencia nos resulta interesante explorar la complementación por OMVs de una mutante Δ*sipC.*

Se ha descrito que OMVs de *S.* Typhimurium cargan SipB y SipC. Además, OMVs de *S.* Typhi entregan SipC en células epiteliales (Kim et al., 2018). De manera interesante, OMVs de *S.* Typhimurium a las 2 horas de incubación entregan SipC en el citoplasma de células en cultivo, mientras que, en el presente trabajo encontramos SipC en la periferia celular a las 2 horas de incubación con OMVs. La discrepancia en la localización de SipC entregado por OMVs de *S.* Typhi y *S.* Typhimurium destaca las diferencias entre OMVs de ambos serovares, resaltando potencialmente otras diferencias en OMVs de ambos serovares, donde posiblemente la ruta de internalización de OMVs de ambos serovares difiere.

Para acercarnos a entender de mejor manera la entrega de factores de virulencia a través de OMVs en células epiteliales, y para realmente determinar si OMVs de *S.* Typhi solo entregan SipC y no SipB decidimos estudiar esto a través de ensayos cuantitativos utilizando la estrategia de actividad β-lactamasa como reportero. Esta técnica, posee como ventaja que tiene una alta sensibilidad (Zlokarnik, 2000; Zlokarnik et al., 1998) y se ha utilizado para estudiar entrega de proteínas a través de OMVs en células epiteliales (Kim et al., 2018). Lamentablemente, solo pudimos realizar este ensayo con OMVs obtenidas desde condiciones estándar de laboratorio y no pudimos realizarlo con OMVs obtenidas desde condiciones de cultivo con alta osmolaridad. Por lo tanto, es necesario realizar más réplicas biológicas de este ensayo para concluir si es que realmente las OMVs de *S.* Typhi solo entregan SipC y no SipB a células en cultivo. En relación con esto, nos preguntamos por qué *Salmonella* utilizaría OMVs como mecanismo de entrega de proteínas considerando que posee un sistema especializado y altamente regulado como el TTSSIII (Kubori et al., 2000).

Especulamos que las OMVs se mantienen como un mecanismo de entrega de proteínas útil para la bacteria porque las OMVs como vehículo de entrega de proteínas implica algunas ventajas. Por ejemplo, la entrega de proteínas de manera independiente de contacto bacteria-hospedero puede entregar factores de virulencia a múltiples células hospederas para promover cambios estructurales y fisiológicos que pueden ser beneficiosos para *S.* Typhi, donde adicionalmente, las OMVs pueden proteger el cargamento de mecanismos de defensa del hospedero (Schwechheimer & Kuehn, 2015). Por estos motivos, y considerando la versatilidad de las OMVs, es posible que estas se han mantenido como mecanismo transversal de entrega de proteínas (Guerrero-Mandujano, Hernández-Cortez, Ibarra, & Castro-Escarpulli, 2017). En relación con las ventajas que ofrecen las OMVs como mecanismo de entrega de proteínas, respecto a SipB y SipC, la entrega de estas proteínas a través de OMVs podría preparar a las células para la interacción con bacterias de *S.* Typhi a través del TTSSIII. Si bien es cierto que se ha demostrado que el TTSSIII es fundamental para la invasión de células en cultivo (Collazo & Galán, 1997; Scherer, Cooper, & Miller, 2000), lo que sugiere un rol menor de las OMVs, es importante tener en cuenta que los experimentos de invasión involucran lavados que eliminarían las OMVs. Este efecto ya se ha visto en otros trabajos, donde el efecto de OMVs se anula por lavados (Marchant et al., 2021). Por otra parte, se ha visto en varios serovares de *Salmonella* que mutantes defectuosas en el TTSSIII (que no invaden células en cultivo) sí pueden hacer ciclos infectivos en modelos animales, sugiriendo la presencia de otras vías de entrega de proteínas (Velge et al., 2012).

En el contexto de evaluar el impacto fisiológico de las OMVs como mecanismo de entrega de SipB y SipC, probamos complementaciones fenotípicas (Figura 28). Respecto a esto, no encontramos resultados positivos. Sin embargo, no podemos descartar el rol

fisiológico de las OMVs de *S.* Typhi en la entrega de factores de virulencia con los experimentos de esta tesis porque creemos que parte del resultado negativo de la complementación fenotípica se debe a que aún no conocemos en profundidad los mecanismos moleculares por los cuales ocurre la entrega de proteínas a través de OMVs de *S.* Typhi, por lo que variables experimentales como el tiempo de incubación juegan un rol importante. Adicionalmente, la complementación fenotípica de dos proteínas puede ser compleja, considerando que puede existir una estequiometría específica entre SipB y SipC para su función como translocón (Myeni et al., 2013). Por lo que sería interesante estudiar la complementación fenotípica solo de SipC, u otros efectores como SopB o SopE.

Sin perjuicio de lo anterior, logramos demostrar la entrega de proteínas por OMVs en células en cultivo, lo que podría tener un impacto biotecnológico en la entrega de drogas por OMVs o incluso en la generación de vacunas a través de presentación heteróloga de antígenos (Wang, Gao, & Wang, 2019). Para apoyar esta eventual aplicación biotecnológica, anteriormente como prueba de concepto construimos fusiones genéticas de la región codificante para el péptido señal de OmpA con la región codificante de la proteína fluorescente roja mCherry. De esta manera, logramos empaquetar mCherry en OMVs de *S.* Typhi y demostramos la entrega de esta proteína en células epiteliales (Figura 24). Con los hallazgos de esta tesis, es plausible pensar que la entrega de mCherry por OMVs en condiciones de cultivo con alta osmolaridad podría aumentar su eficiencia, lo que destaca la condición de cultivo como una novedad y uno de los aportes de este trabajo.

Como desafíos futuros, nos proponemos determinar los mecanismos moleculares por los cuales se internalizan las OMVs de *S.* Typhi, dilucidando la ruta endocítica de OMVs de *S.* Typhi que hasta la fecha se desconoce. Entender de mejor manera la internalización de OMVs y entrega de cargamento, puede ayudar a dilucidar la potencial participación de

OMVs en el ciclo infectivo de *S.* Typhi. Adicionalmente, los conocimientos adquiridos en los siguientes desafíos pueden ser utilizados en potenciales aplicaciones biotecnológicas basadas en la entrega de proteínas por OMVs.

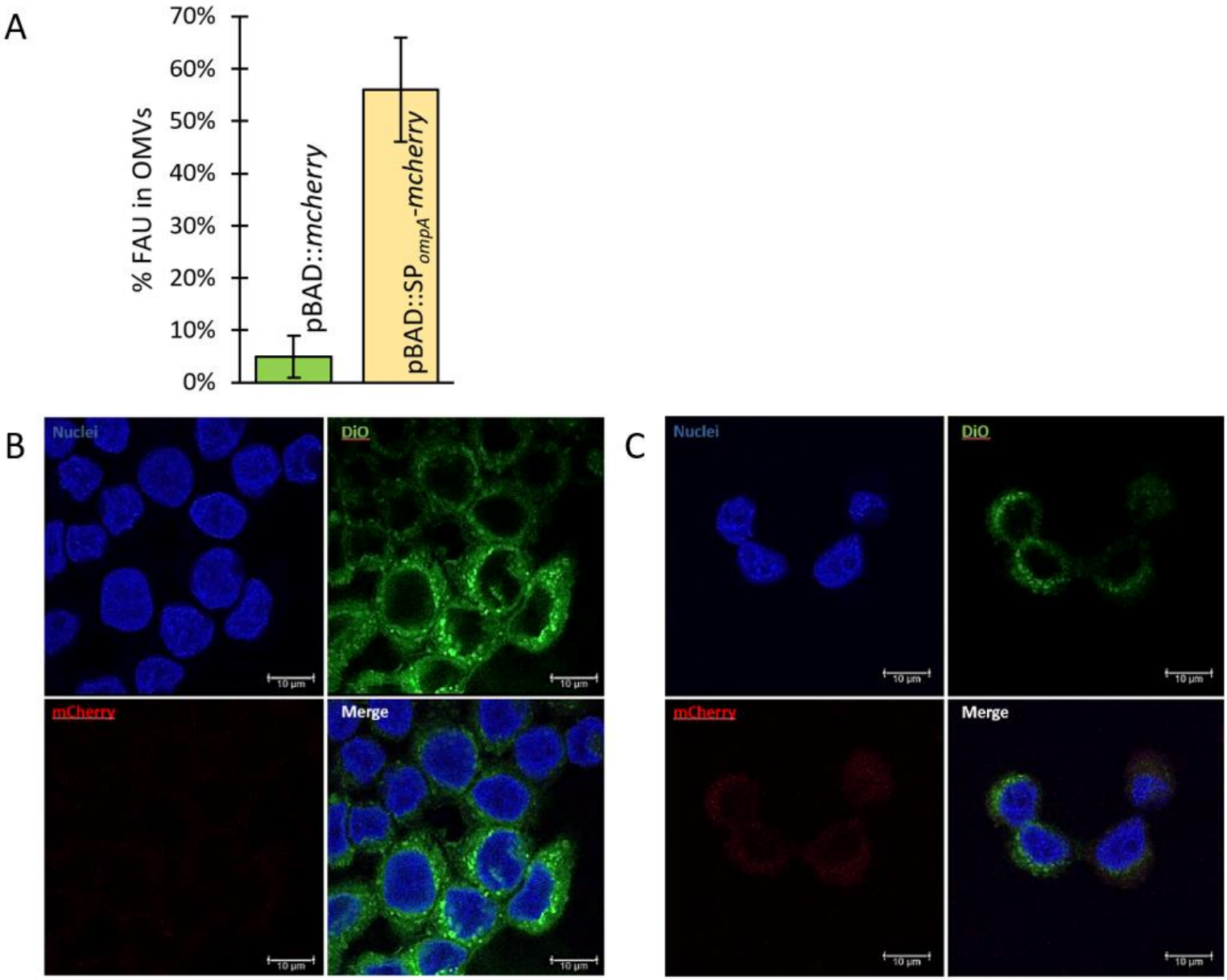


Figura 24. La fusión del péptido señal de OmpA permite la carga y entrega de mCherry por OMVs a células en cultivo. A. *S.* Typhi/pBAD::*mcherry* (*mcherry* clonado bajo el promotor P_{araBAD} del plásmido pBAD) o *S.* Typhi/pBAD::SP_{ompA}-*mcherry* (péptido señal de *ompA* fusionado con *mcherry* clonado bajo el promotor P_{araBAD} del plásmido pBAD) fueron cultivadas en condiciones estándar de laboratorio y se obtuvieron OMVs desde bacterias inducidas con L-Arabinosa. Se midió la fluorescencia relativa de OMVs (% FAU *in* OMVs) en comparación con la fluorescencia total. **B.** y **C.** Células HT-29 incubadas durante 30 min. con 100 µg de OMVs marcadas con **DiO** cuantificadas por proteínas obtenidas desde las cepas *S.* Typhi/pBAD::*mcherry* y *S.* Typhi/pBAD::SP_{ompA}-*mcherry*, respectivamente.

7. CONCLUSIONES

Con este trabajo podemos concluir que la alta osmolaridad modula características de OMVs de *S.* Typhi. Además, la alta osmolaridad favorece la internalización de OMVs y entrega de factores de virulencia en células epiteliales.

El presente trabajo puede contribuye a entender de mejor manera la patogénesis de *S.* Typhi, para en el futuro eventualmente dilucidar la potencial participación de OMVs de *S.* Typhi en su ciclo infectivo, el cual hasta el momento se desconoce.

Adicionalmente, la infomación obtenida en este trabajo de tesis puede potenciar futuras aplicaciones biotecnológicas basadas en la entrega de proteínas mediante OMVs.

8. **ANEXO**

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Vector	**Descripción**
pKD46	Este plásmido posee clonados los genes que codifican para las subunidades Bet (unión a DNA de hebra simple), Gam (inhibición de RecBCD) y Exo (exonucleasa 5´-3´.) de la recombinasa Red del fago λ, bajo el control del promotor P_{araBAD} (este promotor se induce en presencia de L-arabinosa en el medio de cultivo). Además, posee el gen *bla* (que codifica para β-lactamasa; resistencia a ampicilina) y un origen de replicación termosensible (no se replica a temperaturas iguales o superiores a 37°C). Se emplea para generar mutaciones sitio-específicas con productos de PCR, por recombinación catalizada por la recombinasa Red del fago λ mencionada anteriormente (Datsenko & Wanner, 2000).
pCP20	Este plásmido posee clonado el gen que codifica para la recombinasa Flp bajo el control de un promotor termoinducible. Además, posee el gen *bla* y un origen de replicación termosensible (no se replica a temperaturas iguales o superiores a 37°C). Se utiliza para generar deleciones de material genético flanqueado por las secuencias FRT (Flp Recombinase Target), mediante un evento de recombinación sitio-específica catalizado por la recombinasa Flp.
pKD4	Este plásmido posee clonado el gen *aph* (que codifica para la aminoglicósido fosfotransferasa presente en el transposón Tn5) flanqueado por secuencias FRT (Flp Recombinase Target). Además, posee el gen *bla* como marcador de selección (β-lactamasa; resistencia a ampicilina) y un origen de replicación condicional (oriR6K) dependiente de la presencia de la proteína

	Pir. Se utiliza como molde para la amplificación por PCR del gen *aph* en la generación de mutantes mediante reemplazo alélico por transformación directa con productos de PCR (Datsenko & Wanner, 2000).
pSUB11	Este plásmido es muy similar a pKD4, con la diferencia que río arriba del gen *aph* y flanqueado por secuencias FRT, posee la secuencia codificante para el epítopo 3×FLAG. También posee el gen *bla* como marcador de selección y un origen de replicación condicional oriR6K. Se utiliza como molde para la amplificación por PCR del epítopo 3×FLAG y el gen *aph* en la generación de mutantes mediante reemplazo alélico por transformación directa con productos de PCR (Uzzau et al., 2001).
pBAD33.1	Este plásmido es un vector de expresión. Posee el promotor P_{araBAD} inducible por L-Arabinosa en el medio de cultivo. Además, posee el gen *cat* (que codifica para la enzima cloramfenicol acetiltransferasa, la cual proporciona resistencia a cloramfenicol) como marcador de selección. Se utiliza para la expresión de genes de interés. (Addgene, plasmid #36267).

Tabla 3. Partidores utilizados en este trabajo. Los nucleótidos del extremo 3' de color azul o rojo indican hibridación con extremo 5' o 3' del casete de kanamicina (kan) flanqueado por sitios FRT presentes en el plásmido pSUB11 o pKD4, respectivamente (Datsenko & Wanner, 2000; Uzzau et al., 2001).

Partidor	**Secuencia**
Partidores utilizados para la técnica de Uzzau	
F sipB Uzzau	GATGCTTCGCGTTTTATTCTGCGCCAGAGTCGCGCAGACTACAAAGACCATGACGG
R sipB Uzzau	TTATTCCCACATTACTAATTAACATATTTTTCTCCCTATATGAATATCCTCCTTAGTTCC
F sipC Uzzau	AGCATCCGCACTCGCTGCTATCGCAGGCAATATTCGCGCTGACTACAAAGACCATGACGG
R sipC Uzzau	CATAATATCCCCAGTTCGCCATCAGGAGGGCGATTAATATGAATATCCTCCTTAGTTCC
F ompC Uzzau	CACCGACGACATCGTAGCGCTGGGTCTGGTTTACCAGTTCGACTACAAAGACCATGA
R ompC Uzzau	CGGCAAAAAGTCATTTTCATCGCTGTTTATCCTCATTCGAGAATATCCTCCTTAGTTCC
Partidores utilizados para la técnica de Datsenko y Wanner	
sipBC (H1+P1)	AAATGACGCAAGTAGCATTAGCCGTAGCGGATATACCCAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
sipBC (H2+P2)	CATTGTTTTCAGCATTTCCTGAATCAGGCTGGTCGATATATGAATATCCTCCTTAGTTCC
invA (H1+P1)	GTGCTGCTTTCTCTACTTAACAGTGCTCGTTTACGACCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
invA (H2+P2)	CAGGAAATTTCGCTTCCAGTTGGTCCAGCATATGTTTTGTCATATGAATATCCTCCTTAG
Partidores comprobatorios	
F sipB comp	CTGCAAACGAATGCCTTA
R sipB comp	CCCACATTACTAATTAACAT

F sipC comp	TTCGTCTTGAGCAGAATACC
R sipC comp	GAGAAGCGGAATAATTTTGAAT
F ompC comp	GAACAACATCTATCTGGCA
R ompC comp	CGGCAAAAAGTCATTTTCAT
F sipBC	GGCGGTATGCCAACTGAAAA
R sipBC	CGCGGGAAAATCTTCCAGTT
F invA	GCATGAAATGGCAGAACAGC
R invA	AATTGCGCCCAGATCCATAC
F pBAD	ATGCCATAGCATTTTTATCC
R pBAD	GATTTAATCTGTATCAGG
Partidores utilizados para la técnica de *Gibson Assembly*	
F pBAD33.1 div	TGGCTAGCATGACTGGTGGA
R pBAD33.1 div	CGAGCTCGAATTCGCTAGCC
F sipB	CATACCCGTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCGAGCTCGGTACATGG TAAATGACGCAAGTAG
R sipB	GATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGTGCG CGACTCTGGCGC
F bla (sipB)	TGCGGATGCTTCGCGTTTTATTCTGCGCCAGAGTCGCGCACACC CAGAAACGCTGGTG
R bla (sipB)	AAGTATAGGAACTTCGAAGCAGCTCCAGCCTACATTTACCAATG CTTAATCAGTGAG
F kan	CTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAATGTAGGCT GGAGCTGCTT

R kan	ATTTGCTGTCCACCAGTCATGCTAGCCAGAATATCCTCCTTAGTTCCT
F sipC	CATACCCGTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCGAGCTCGGTACATGTTAATTAGTAATGTGGG
R sipC	AGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCGCGAATATTGCCTG
F bla (sipC)	ATCCGCACTCGCTGCTATCGCAGGCAATATTCGCGCTCACCCAGAAACGCTG
R bla (sipC)	AAGTATAGGAACTTCGAAGCAGCTCCAGCCTACATTTACCAATGCTTAATCAGTGAG
Partidores utilizados para secuenciar fusiones genéticas	
R sipB 565	GCTTCTTTTCCGGCCTGTT
F sipB 1645	AGCAGTGGCTTAAACAATCCG
R bla 321	AGAAGTAAGTTGGCCGCAGT
R sipC 545	GTGATCCCCAACTGAAGC
F sipC 948	GATGCGCGCAAGATGCAGA

Tabla 4. Cepas utilizadas en este trabajo.

Genotipo	**Resistente a**
STH2370	-
STH2370 *sipB*-3×FLAG	-
STH2370 *sipC*-3×FLAG	-
STH2370/pBAD33.1::*sipB-bla*	Cam^R, Kan^R
STH2370/pBAD33.1::*sipC-bla*	Cam^R, Kan^R
STH2370 *ompC*-3×FLAG	-
STH2370 *ΔsipBC*::FRT	-
STH2370 *ΔinvA*::FRT	-

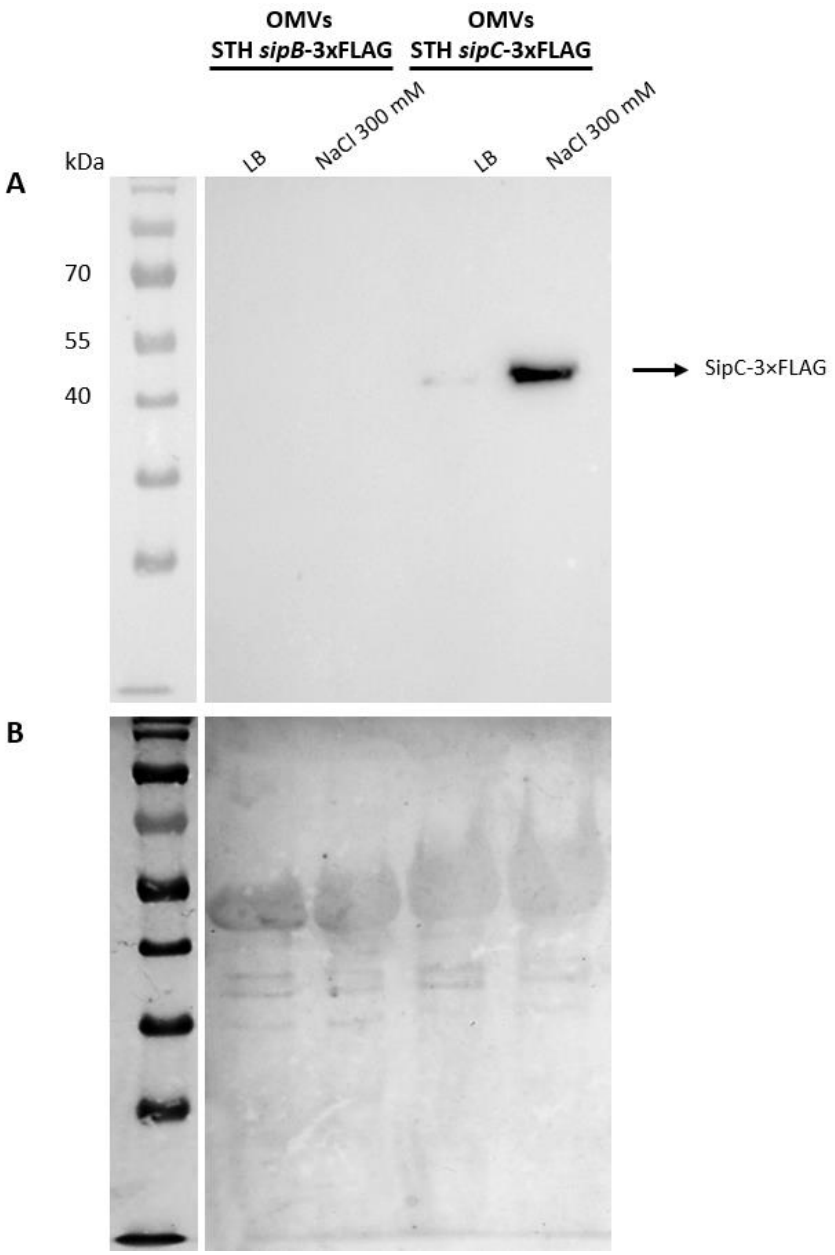


Figura 25. La alta osmolaridad aumenta la carga de SipC en OMVs de *S.* Typhi (Anticuerpo secundario conjugado con HRP). A. Inmunodetección por *Western Blot* de SipB y SipC en OMVs de *S.* Typhi obtenidas desde condiciones estándar de laboratorio (LB) y condiciones de cultivo con alta osmolaridad (NaCl 300 mM). **B.** Tinción de proteínas transferidas a la membrana de nitrocelulosa con rojo Ponceau S como control de carga. En cada carril se cargó 30 µg de proteína. El estándar utilizado es *PageRuler*^{TM} *Prestained Protein Ladder* (Invitrogen).

Nos preguntamos si SipB y SipC entregado por OMVs en células epiteliales pueden cumplir su rol como translocón del inyectisoma. Para esto, diseñamos un ensayo de complementación: Incubamos OMVs obtenidas desde la cepa silvestre en células HT-29 durante 3 horas, esperando que se disponga el translocón del inyectisoma en la membrana de las células para luego infectar con una mutante carente de translocón (Δ*sipBC*), esperando una reversión del fenotipo no invasivo de dicha mutante. Como control del experimento, la mutante Δ*invA* no debería recuperar el fenotipo invasivo, ya que su fenotipo no invasivo se debe a la nula capacidad de translocación de proteínas a través del inyectisoma y no a la falta de translocón.

En la Figura 26 se muestra el esquema de construcción de las mutantes Δ*invA* y Δ*sipBC* y los amplicones esperados en cada caso con los partidores comprobatorios. Las mutantes se construyeron según la técnica descrita en (Datsenko & Wanner, 2000).

En la Figura 27 se muestran los amplicones obtenidos en el chequeo de la construcción de las mutantes Δ*invA* y Δ*sipBC*. Como resultado, encontramos una correcta construcción de las mutantes, donde se obtuvieron tamaños de amplicones según lo esperado.

Se espera que las mutantes Δ*invA* y Δ*sipBC* no sean capaces de invadir (Collazo & Galán, 1997; Scherer et al., 2000). Por lo tanto, para comprobar la construcción de las mutantes, se realizaron ensayos de protección a gentamicina, como se describe en (L. M. Valenzuela et al., 2015) para comprobar los fenotipos no invasivos de las mutantes. Como resultado, encontramos que las mutantes Δ*invA* y Δ*sipBC* no son capaces de invadir, lo que confirma una correcta construcción de las mutantes (Figura 28 A). Luego, realizamos el ensayo de complementación propuesto anteriormente y encontramos que la cepa mutante Δ*sipBC* no recuperó el fenotivo invasivo (Figura 28 B). Vale mencionar, que en los ensayos

no se utilizó la cepa Δ*invA* como control ya que los experimentos correspondían a una prueba de concepto. En caso de encontrar complementación, para asegurar que el efecto es por entrega de SipB y SipC por OMVs usaríamos la mutante Δ*invA* como control.

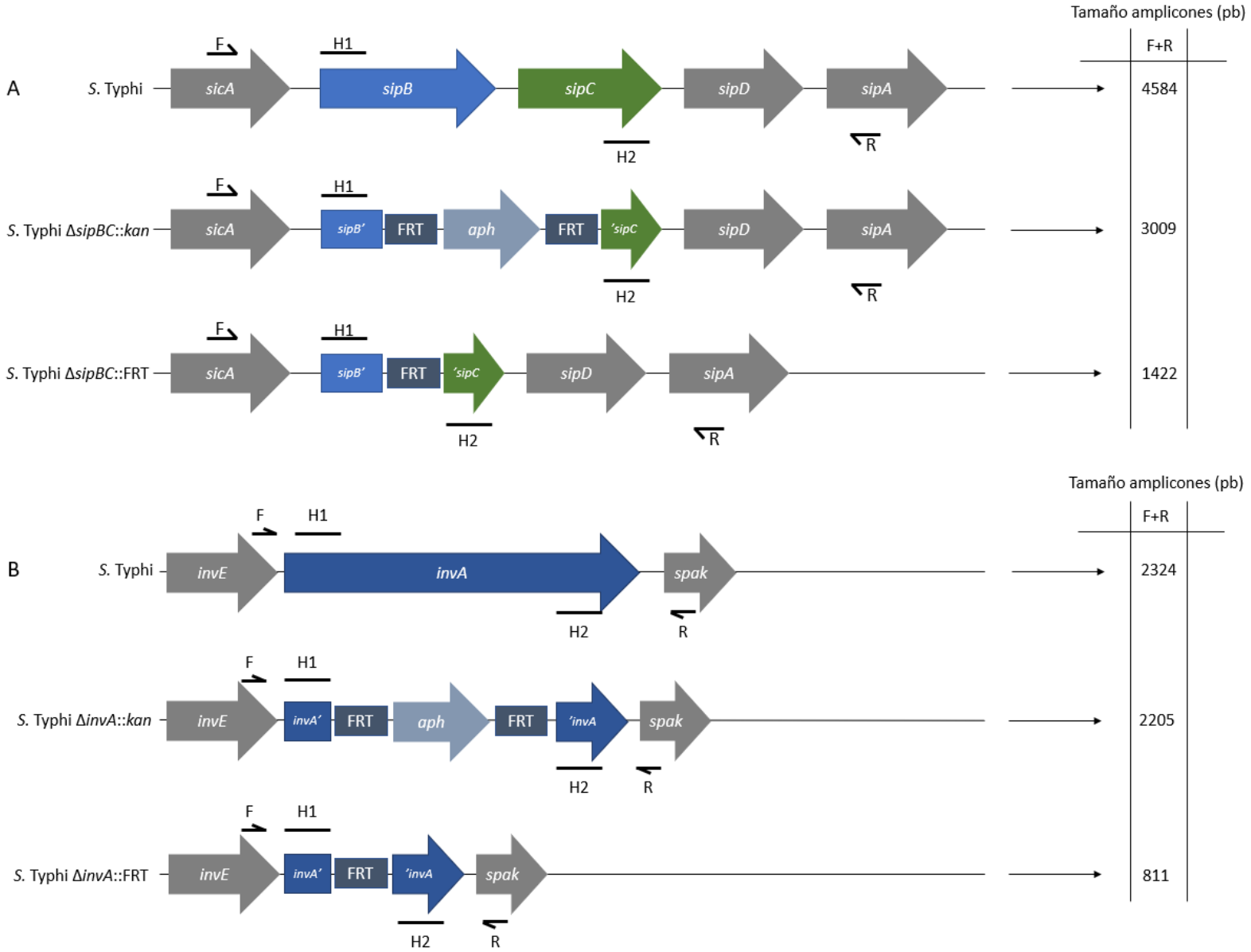


Figura 26. Esquema de construcción de mutantes Δ*invA* y Δ*sipBC*. Representación esquemática del contexto genético *sipB, sipC,* e *invA* en *S.* Typhi. En todos los casos con F y R se indican los partidores comprobatorios *forward* (F) y *reverse* (R) utilizados para chequear las mutantes y también se indica el amplicón esperado con cada par de partidores comprobatorios. H1 y H2 representan las zonas de homología utilizadas para delecionar *sipBC* e *invA.* **A.** Construcción de mutante Δ*sipBC*. **B.** Construcción mutante Δ*invA.*

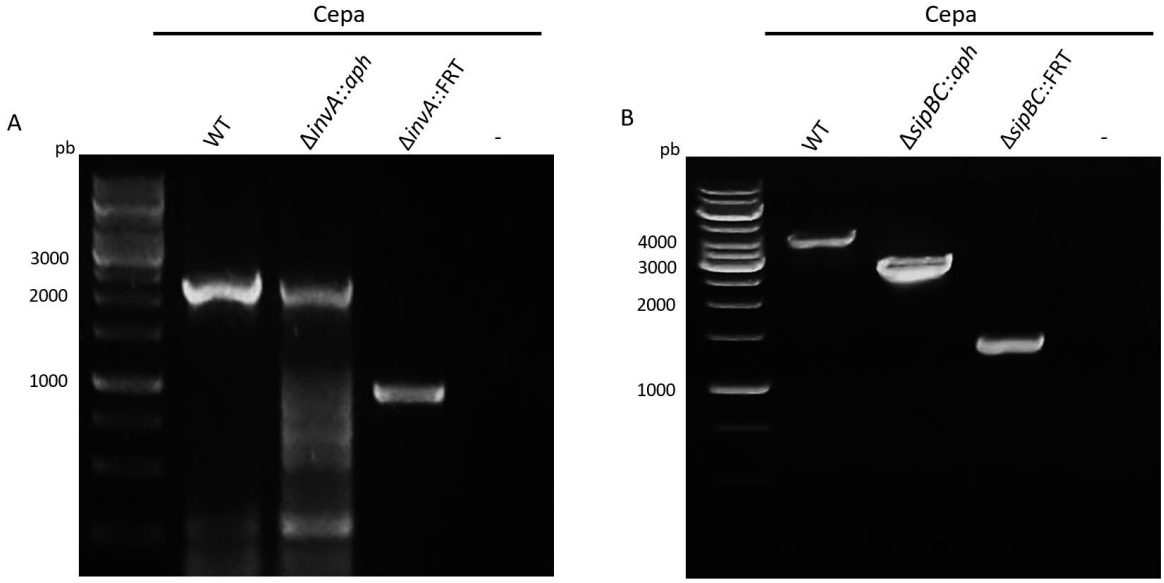


Figura 27. Construcción de mutantes Δ*invA* y Δ*sipBC.* Electroforesis en gel de agarosa 1% en el que se cargaron los productos de PCR comprobatorios para las mutantes **A.** Δ*invA* y **B.** Δ*sipBC*. WT indica la cepa silvestre de *S.* Typhi y – indica control sin templado. El estándar utilizado es *GeneRuler*^{TM} *1 kb DNA Ladder* (Invitrogen).

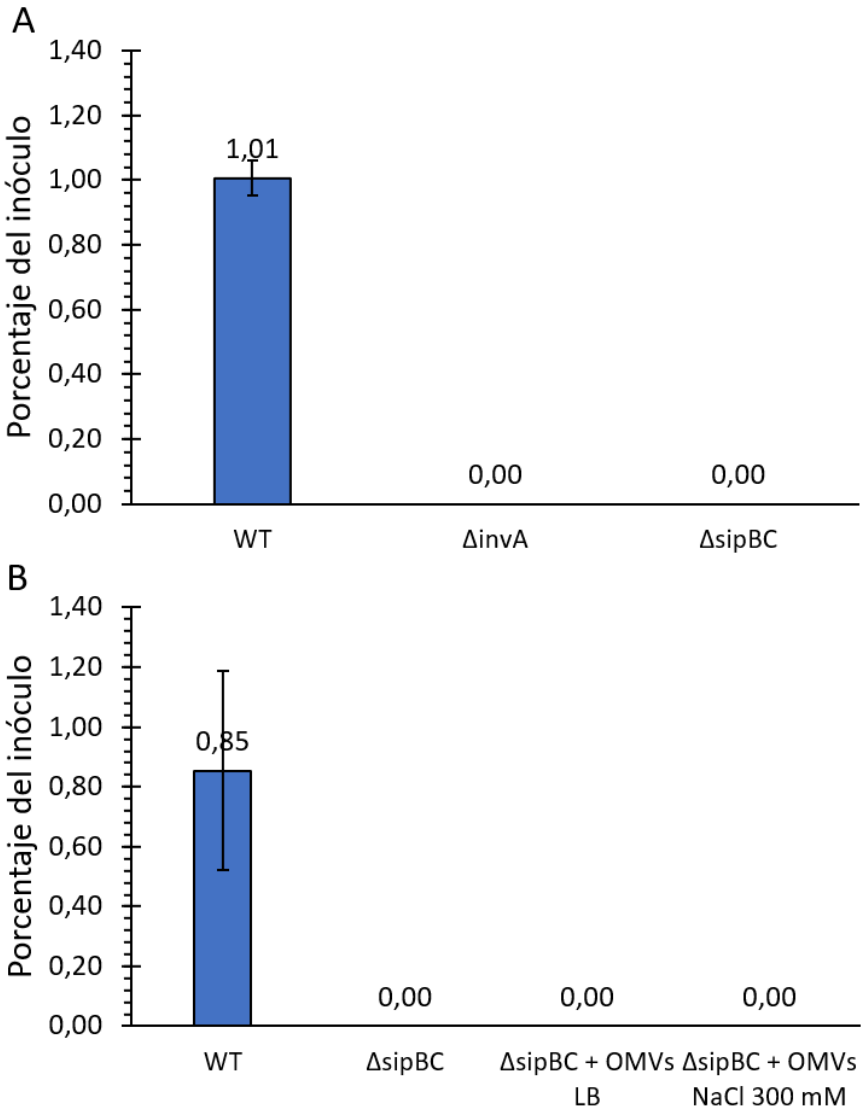


Figura 28. Ensayo de protección a gentamicina y ensayo de complementación. A. Ensayo de protección a gentamicina en el que células HT-29 con confluencia aproximadamente del 90% fueron infectadas con *S.* Typhi WT, *S.* Typhi Δ*invA* o *S.* Typhi Δ*sipBC*. (Experimento representativo n = 3). **B.** Ensayo de complementación en el que células HT-29 con confluencia aproximadamente del 90% fueron incubadas por 3 h. con OMVs de *S.* Typhi WT obtenidas desde condiciones de cultivo estándar (LB) o condiciones de cultivo con alta osmolaridad (NaCl 300 mM), para luego infectar con *S.* Typhi Δ*sipBC*. Como control positivo de invasión se utilizó la cepa silvestre (WT) y como control negativo la cepa Δ*sipBC*. (Experimento representativo n = 2).

9. REFERENCIAS

Aguilera, J., & Sun, J. (2021). Measuring Cytosolic Translocation of Mycobacterium marinum in RAW264.7 Macrophages with a CCF4-AM FRET Assay. *Bio-protocol, 11*(8), e3991. doi:10.21769/BioProtoc.3991

Arricau, N., Hermant, D., Waxin, H., Ecobichon, C., Duffey, P. S., & Popoff, M. Y. (1998). The RcsB–RcsC regulatory system of Salmonella typhi differentially modulates the expression of invasion proteins, flagellin and Vi antigen in response to osmolarity. *Molecular Microbiology, 29*(3), 835-850. doi:https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00976.x

Bai, J., Kim, S. I., Ryu, S., & Yoon, H. (2014). Identification and characterization of outer membrane vesicle-associated proteins in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Infection and immunity, 82*(10), 4001-4010. doi:10.1128/IAI.01416-13

Beyzavi, K., Hampton, S., Kwasowski, P., Fickling, S., Marks, V., & Clift, R. (1987). Comparison of Horseradish Peroxidase and Alkaline Phosphatase-Labelled Antibodies in Enzyme Immunoassays. *Annals of Clinical Biochemistry, 24*(2), 145-152. doi:10.1177/000456328702400204

Bielaszewska, M., Rüter, C., Bauwens, A., Greune, L., Jarosch, K.-A., Steil, D., . . . Karch, H. (2017). Host cell interactions of outer membrane vesicle-associated virulence factors of enterohemorrhagic Escherichia coli O157: Intracellular delivery, trafficking and mechanisms of cell injury. *PLOS Pathogens, 13*(2), e1006159. doi:10.1371/journal.ppat.1006159

Bielaszewska, M., Rüter, C., Kunsmann, L., Greune, L., Bauwens, A., Zhang, W., . . . Karch, H. (2013). Enterohemorrhagic Escherichia coli Hemolysin Employs Outer Membrane Vesicles to Target Mitochondria and Cause Endothelial and Epithelial Apoptosis. *PLOS Pathogens, 9*(12), e1003797. doi:10.1371/journal.ppat.1003797

Bonnington Katherine, E., & Kuehn Meta, J. (2016). Outer Membrane Vesicle Production Facilitates LPS Remodeling and Outer Membrane Maintenance in Salmonella during Environmental Transitions. *mBio, 7*(5), e01532-01516. doi:10.1128/mBio.01532-16

Bonnington, K. E., & Kuehn, M. J. (2014). Protein selection and export via outer membrane vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1843*(8), 1612-1619. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.12.011

Collazo, C. M., & Galán, J. E. (1997). The invasion-associated type III system of Salmonella typhimurium directs the translocation of Sip proteins into the host cell. *Molecular Microbiology, 24*(4), 747-756. doi:https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.3781740.x

Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M. L., . . . Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 32*(6), 767-775. doi:10.1177/1040638720905833

Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97*(12), 6640-6645. doi:10.1073/pnas.120163297

Deatherage, B. L., Lara, J. C., Bergsbaken, T., Barrett, S. L. R., Lara, S., & Cookson, B. T. (2009). Biogenesis of bacterial membrane vesicles. *Molecular Microbiology, 72*(6), 1395-1407. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06731.x

Guerrero-Mandujano, A., Hernández-Cortez, C., Ibarra, J. A., & Castro-Escarpulli, G. (2017). The outer membrane vesicles: Secretion system type zero. *Traffic*, *18*(7), 425-432. doi:https://doi.org/10.1111/tra.12488

Hayward, R. D., & Koronakis, V. (1999). Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive Salmonella. *The EMBO journal*, *18*(18), 4926-4934. doi:https://doi.org/10.1093/emboj/18.18.4926

Hed, J., Hallden, G., Johansson, S. G. O., & Larsson, P. (1987). The use of fluorescence quenching in flow cytofluorometry to measure the attachment and ingestion phases in phagocytosis in peripheral blood without prior cell separation. *Journal of Immunological Methods*, *101*(1), 119-125. doi:https://doi.org/10.1016/0022-1759(87)90224-9

Jofré, M. R., Rodríguez, L. M., Villagra, N. A., Hidalgo, A. A., Mora, G. C., & Fuentes, J. A. (2014). RpoS integrates CRP, Fis, and PhoP signaling pathways to control Salmonella Typhi hlyE expression. *BMC Microbiology*, *14*(1), 139. doi:10.1186/1471-2180-14-139

Johnson, R., Mylona, E., & Frankel, G. (2018). Typhoidal Salmonella: Distinctive virulence factors and pathogenesis. *Cellular microbiology*, *20*(9), e12939. doi:https://doi.org/10.1111/cmi.12939

Johnson, R., Ravenhall, M., Pickard, D., Dougan, G., Byrne, A., & Frankel, G. (2018). Comparison of Salmonella enterica Serovars Typhi and Typhimurium Reveals Typhoidal Serovar-Specific Responses to Bile. *Infection and immunity*, *86*(3), e00490-00417. doi:10.1128/IAI.00490-17

Kaniga, K., Tucker, S., Trollinger, D., & Galán, J. E. (1995). Homologs of the Shigella IpaB and IpaC invasins are required for Salmonella typhimurium entry into cultured epithelial cells. *Journal of bacteriology*, *177*(14), 3965-3971. doi:10.1128/jb.177.14.3965-3971.1995

Kaur, J., & Jain, S. K. (2012). Role of antigens and virulence factors of Salmonella enterica serovar Typhi in its pathogenesis. *Microbiological Research*, *167*(4), 199-210. doi:https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.08.001

Kim, S. I., Kim, S., Kim, E., Hwang, S. Y., & Yoon, H. (2018). Secretion of Salmonella Pathogenicity Island 1-Encoded Type III Secretion System Effectors by Outer Membrane Vesicles in Salmonella enterica Serovar Typhimurium. *Frontiers in microbiology*, *9*, 2810-2810. doi:10.3389/fmicb.2018.02810

Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S.-I., & Galán, J. E. (2000). Molecular characterization and assembly of the needle complex of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(18), 10225-10230. doi:10.1073/pnas.170128997

Lara-Tejero, M., & Galán, J. E. (2009). Salmonella enterica serovar typhimurium pathogenicity island 1-encoded type III secretion system translocases mediate intimate attachment to nonphagocytic cells. *Infection and immunity*, *77*(7), 2635-2642. doi:10.1128/IAI.00077-09

LIM, S.-Y., YONG, K.-H., RYU, S.-R. J. J. o. m., & biotechnology. (2005). Analysis of Salmonella pathogenicity island 1 expression in response to the changes of osmolarity. *15*(1), 175-182.

Lou, L., Zhang, P., Piao, R., & Wang, Y. (2019). Salmonella Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and Its Complex Regulatory Network. *Front Cell Infect Microbiol*, *9*(270). doi:10.3389/fcimb.2019.00270

Marchant, P., Carreño, A., Vivanco, E., Silva, A., Nevermann, J., Otero, C., . . . Fuentes, J. A. (2021). “One for All”: Functional Transfer of OMV-Mediated Polymyxin B Resistance From Salmonella enterica sv. Typhi ΔtolR and ΔdegS to Susceptible Bacteria. *Frontiers in microbiology*, *12*.

McBroom, A. J., & Kuehn, M. J. (2007). Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Molecular Microbiology*, *63*(2), 545-558. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05522.x

Myeni, S. K., Wang, L., & Zhou, D. (2013). SipB-SipC complex is essential for translocon formation. *PloS one*, *8*(3), e60499-e60499. doi:10.1371/journal.pone.0060499

Nevermann, J., Silva, A., Otero, C., Oyarzún, D. P., Barrera, B., Gil, F., . . . Fuentes, J. A. (2019). Identification of Genes Involved in Biogenesis of Outer Membrane Vesicles (OMVs) in Salmonella enterica Serovar Typhi. *Frontiers in microbiology*, *10*, 104-104. doi:10.3389/fmicb.2019.00104

O'Donoghue, E. J., & Krachler, A. M. (2016). Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells. *Cellular microbiology*, *18*(11), 1508-1517. doi:10.1111/cmi.12655

Orench-Rivera, N., & Kuehn, M. J. (2016). Environmentally controlled bacterial vesicle-mediated export. *Cellular microbiology*, *18*(11), 1525-1536. doi:https://doi.org/10.1111/cmi.12676

Ortega, A. P., Villagra, N. A., Urrutia, I. M., Valenzuela, L. M., Talamilla-Espinoza, A., Hidalgo, A. A., . . . Fuentes, J. A. (2016). Lose to win: marT pseudogenization in Salmonella enterica serovar Typhi contributed to the surV-dependent survival to H2O2, and inside human macrophage-like cells. *Infection, Genetics and Evolution*, *45*, 111-121. doi:https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.029

Parra, F. (2019). Mutaciones en genes asociados a vesiculación de S. Typhi tienen una participación en cómo las Vesículas de Membrana externa (OMVs) entran a células epiteliales en cultivo.

Parra, F. (2021). *Mutations in the Salmonella Typhi zzz genes impacts on OMVs internalization and uptake kinetics in epithelial cells in culture.*

Phoebe Lostroh, C., & Lee, C. A. (2001). The Salmonella pathogenicity island-1 type III secretion system. *Microbes and Infection*, *3*(14), 1281-1291. doi:https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01488-5

Pickard, D., Li, J., Roberts, M., Maskell, D., Hone, D., Levine, M., . . . Chatfield, S. (1994). Characterization of defined ompR mutants of Salmonella typhi: ompR is involved in the regulation of Vi polysaccharide expression. *Infection and immunity*, *62*(9), 3984-3993. doi:10.1128/iai.62.9.3984-3993.1994

Pinto da Silva, P., & Kan, F. W. (1984). Label-fracture: a method for high resolution labeling of cell surfaces. *Journal of Cell Biology*, *99*(3), 1156-1161. doi:10.1083/jcb.99.3.1156

Ramos-Morales, F. (2012). Impact of Salmonella enterica type III secretion system effectors on the eukaryotic host cell. *ISRN Cell Biology*, *2012*, 787934. doi:10.5402/2012/787934

Rueter, C., & Bielaszewska, M. (2020). Secretion and Delivery of Intestinal Pathogenic Escherichia coli Virulence Factors via Outer Membrane Vesicles. *Front Cell Infect Microbiol*, *10*.

Sabbagh, S. C., Forest, C. G., Lepage, C., Leclerc, J.-M., & Daigle, F. (2010). So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of Salmonella enterica serovars Typhimurium and Typhi. *FEMS Microbiology Letters*, *305*(1), 1-13. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.01904.x

Scherer, C. A., Cooper, E., & Miller, S. I. (2000). The Salmonella type III secretion translocon protein SspC is inserted into the epithelial cell plasma membrane upon infection. *Molecular Microbiology, 37*(5), 1133-1145. doi:https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02066.x

Schwechheimer, C., & Kuehn, M. J. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nature reviews. Microbiology, 13*(10), 605-619. doi:10.1038/nrmicro3525

Sidhu, V. K., Vorhölter, F.-J., Niehaus, K., & Watt, S. A. (2008). Analysis of outer membrane vesicle associated proteins isolated from the plant pathogenic bacterium Xanthomonas campestris pv. campestris. *BMC Microbiology, 8*(1), 87. doi:10.1186/1471-2180-8-87

Taheri, N., Mahmud, A. K. M. F., Sandblad, L., Fällman, M., Wai, S. N., & Fahlgren, A. (2018). Campylobacter jejuni bile exposure influences outer membrane vesicles protein content and bacterial interaction with epithelial cells. *Scientific Reports, 8*(1), 16996. doi:10.1038/s41598-018-35409-0

Toyofuku, M., Nomura, N., & Eberl, L. (2019). Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nature Reviews Microbiology, 17*(1), 13-24. doi:10.1038/s41579-018-0112-2

Turner, L., Bitto, N. J., Steer, D. L., Lo, C., D'Costa, K., Ramm, G., . . . Kaparakis-Liaskos, M. (2018a). Helicobacter pylori Outer Membrane Vesicle Size Determines Their Mechanisms of Host Cell Entry and Protein Content. *9*. doi:10.3389/fimmu.2018.01466

Turner, L., Bitto, N. J., Steer, D. L., Lo, C., D'Costa, K., Ramm, G., . . . Kaparakis-Liaskos, M. (2018b). Helicobacter pylori Outer Membrane Vesicle Size Determines Their Mechanisms of Host Cell Entry and Protein Content. *Frontiers in Immunology, 9*.

Urrutia, I. M., Fuentes, J. A., Valenzuela, L. M., Ortega, A. P., Hidalgo, A. A., & Mora, G. C. (2014). Salmonella Typhi shdA: Pseudogene or allelic variant? *Infection, Genetics and Evolution, 26*, 146-152. doi:https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.05.013

Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S., & Bossi, L. (2001). Epitope tagging of chromosomal genes in <em>Salmonella</em&gt. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 98*(26), 15264. doi:10.1073/pnas.261348198

Valenzuela, C., Ugalde, J. A., Mora, G. C., Alvarez, S., Contreras, I., & Santiviago, C. A. (2014). Draft Genome Sequence of Salmonella enterica Serovar Typhi Strain STH2370. *Genome announcements, 2*(1), e00104-00114. doi:10.1128/genomeA.00104-14

Valenzuela, L. M., Hidalgo, A. A., Rodríguez, L., Urrutia, I. M., Ortega, A. P., Villagra, N. A., . . . Fuentes, J. A. (2015). Pseudogenization of sopA and sopE2 is functionally linked and contributes to virulence of Salmonella enterica serovar Typhi. *Infection, Genetics and Evolution, 33*, 131-142. doi:https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.04.021

Velge, P., Wiedemann, A., Rosselin, M., Abed, N., Boumart, Z., Chaussé, A. M., . . . Virlogeux-Payant, I. (2012). Multiplicity of Salmonella entry mechanisms, a new paradigm for Salmonella pathogenesis. *MicrobiologyOpen, 1*(3), 243-258. doi:https://doi.org/10.1002/mbo3.28

Wang, S., Gao, J., & Wang, Z. (2019). Outer membrane vesicles for vaccination and targeted drug delivery. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology, 11*(2), e1523. doi:https://doi.org/10.1002/wnan.1523

Zlokarnik, G. (2000). [15] Fusions to β-lactamase as a reporter for gene expression in live mammalian cells. In *Methods in Enzymology* (Vol. 326, pp. 221-241): Academic Press.

Zlokarnik, G., Negulescu, P. A., Knapp, T. E., Mere, L., Burres, N., Feng, L., . . . Tsien, R. Y. (1998). Quantitation of Transcription and Clonal Selection of Single Living Cells with β-Lactamase as Reporter. *Science, 279*(5347), 84-88. doi:10.1126/science.279.5347.84