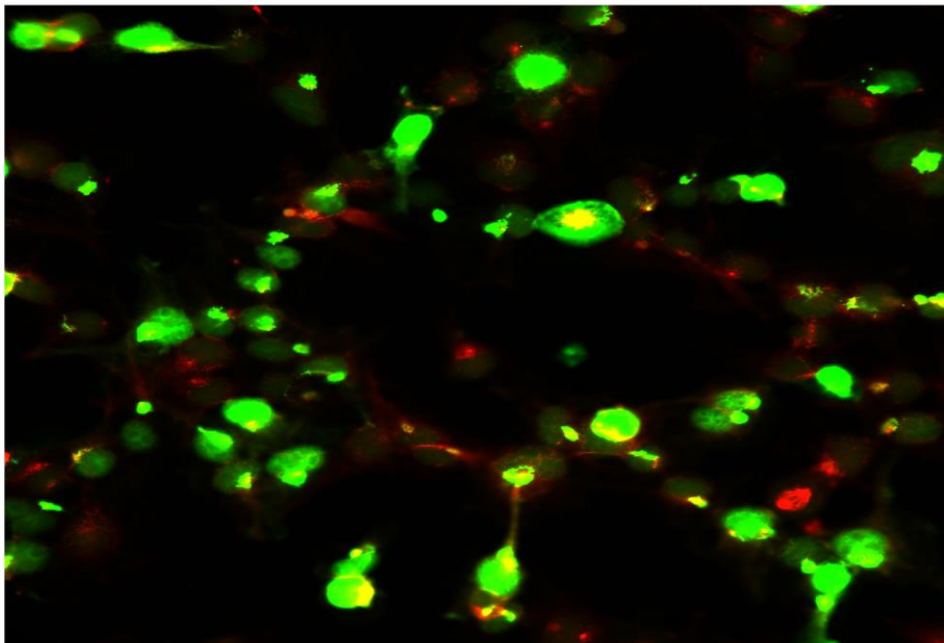




Departamento de Genética  
Universidad de Sevilla

**Implicaciones biológicas de las interacciones con  
proteínas del hospedador de SseK1 y SlrP, dos efectores  
de los sistemas de secreción tipo III de *Salmonella***



**Juan Luis Araujo Garrido**

Tesis Doctoral  
2021





Departamento de Genética  
Universidad de Sevilla

**Implicaciones biológicas de las interacciones con  
proteínas del hospedador de SseK1 y SlrP, dos efectores  
de los sistemas de secreción tipo III de *Salmonella***

Trabajo presentado para optar al  
Grado de Doctor en Biología por el Graduado

Juan Luis Araujo Garrido

Sevilla, Julio de 2021

Directores:

Francisco Ramos Morales  
Catedrático de Genética

Joaquín Bernal Bayard  
Profesor contratado Doctor



# Agradecimientos

---

No pocas veces he pensado palabras que incluir en este apartado y, ahora que llega la hora de plasmar en papel los agradecimientos, la hoja en blanco me consume. Sin embargo, todos sabemos que al final ésta es una de las partes más leídas por todo el mundo, así que despacito y con buena letra espero completarlo y quedar satisfecho. Esta etapa no ha sido un camino de rosas, con muchas dificultades en el camino y con algunas cosas que cambiaría, incluido de mí mismo, pero sin duda volvería a pasar por ella por todo el aprendizaje obtenido y las experiencias y personas que me llevo conmigo. No están aquí todos los que son, pero son todos los que están.

En primer lugar, quiero agradecer a Paco, mi director de Tesis, la oportunidad que me brindó para realizar el doctorado cuando yo comenzaba a tener serias dudas de que pudiera continuar en la ciencia. Apostaste por mí y espero haberte correspondido. Al igual que otros compañeros antes que yo, estoy realmente admirado por la capacidad de orden y registro que tienes para realizar el trabajo, y con que se me haya pegado una mínima parte me daría con un canto en los dientes. Muchísimas gracias por orientarme cuando ha sido necesario (que no han sido pocas veces) y también por escucharme cada vez que he tenido cualquier pregunta que hacerte, por insignificante que fuese.

Asimismo, se merece el mismo agradecimiento Joaquín, mi codirector de Tesis. Aunque no hayas estado desde el momento cero, eres una parte fundamental de que este proyecto haya finalizado con éxito. Llegaste como un soplo de aire fresco, con ideas y puntos de vista nuevos sobre lo que trabajábamos, sin la obcecación propia de quien lleva ya un tiempo con puntos de vista inamovibles en algunos asuntos. Muchísimas gracias por confiar en mí, animarme cuando me has visto más apagado, y por decirme las cosas claras siempre (tanto las que gustan oír como las que no). Estoy muy agradecido por tu exigencia y a la vez buen rollo, creo que eres una persona íntegra y para mí realmente supones un ejemplo a seguir.

No quiero dejar de agradecer a todos los compañeros del departamento (técnicos, doctorandos, profesores) que han estado a lo largo de mi etapa y que, algunos en mayor medida y otros menos, me han acompañado por este camino y compartido alegrías y penas. Julia, no hay palabras suficientes para decir lo que he disfrutado en el tiempo que hemos estado juntos en el laboratorio, cada vez que hayamos tenido que discutir sobre experimentos o charlar sobre cualquier cosa que se terciara. Gracias por ser mi guía los primeros días y ser siempre la primera piedra de toque de mis pensamientos aunque ni te fueran ni te vinieran. Andrea, a la vista está desde que hiciste el TFM con nosotros que eres una crack y no dudo de que el doctorado va a irte genial. No imagino mejor relevo que tú.

Me parece justo mostrar mi agradecimiento a los profesores de las diferentes asignaturas de ciencias que tuve durante la etapa de Secundaria y Bachillerato en el IES Santa Aurelia. Gracias a su desempeño y entusiasmo despertó en mí la vocación científica, y sin su aportación hoy no estaría donde estoy. Gracias José Luis por sugerirme que le echara un ojo a una tal carrera de Biotecnología.

Por último, la parte más importante. *¿Cuándo vas a acabar la tesis?* Muchísimas gracias a mi familia y amigos por acompañarme siempre de forma incondicional, por animarme siempre a apretar un poquito más y no venirme abajo fuera cual fuera la situación. Laura, esto tampoco habría sido posible finalizarlo sin ti. No te conocía cuando todo esto empezó, y ahora no imagino mi vida si tú no estuvieras. Gracias a todos vosotros, sois mi mayor tesoro y espero conservaros conmigo siempre.

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la ayuda a la investigación recibida de las siguientes entidades:

- Ministerio de Economía, Industria y Competitividad – Agencia Estatal de Investigación y FEDER: proyecto SAF2016-75365-R y proyecto de infraestructuras FEDER UNSE15-CE-3185
- Ministerio de Ciencia e Innovación – Agencia Estatal de Investigación/10.13039/501100011033: proyecto PID2019-106132RB-I00.
- VI Plan Propio de Investigación y Transferencia de la Universidad de Sevilla.

# Índice

---

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>5</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>7</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>11</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>13</b>
<b>LISTADO DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>15</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>19</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>21</b>
1. EL GÉNERO SALMONELLA .....	23
2. EVOLUCIÓN DE SALMONELLA Y SU PATOGENICIDAD .....	24
3. PROCESO DE INFECCIÓN POR S. ENTERICA .....	25
4. FACTORES DE VIRULENCIA DE SALMONELLA .....	28
a. <i>Salmonella Pathogenicity Island 1 (SPI-1)</i> .....	29
b. <i>Salmonella Pathogenicity Island 2 (SPI-2)</i> .....	29
c. <i>Otras islas de patogenicidad</i> .....	30
d. <i>Plásmido de virulencia</i> .....	32
e. <i>Adhesinas</i> .....	32
5. SISTEMAS DE SECRECIÓN.....	32
a. <i>Sistemas de secreción tipo I (T1SS)</i> .....	34
b. <i>Sistemas de secreción tipo II (T2SS)</i> .....	34
c. <i>Sistemas de secreción tipo III (T3SS)</i> .....	34
d. <i>Sistemas de secreción tipo IV (T4SS)</i> .....	36
e. <i>Sistemas de secreción tipo V (T5SS)</i> .....	36
f. <i>Sistemas de secreción tipo VI (T6SS)</i> .....	37
g. <i>Sistemas de secreción de tipo VIII (T8SS)</i> .....	37
h. <i>Sistemas de secreción de tipo IX (T9SS)</i> .....	37
i. <i>Sistemas de secreción de tipo X (T10SS)</i> .....	38
j. <i>Sistemas de secreción CU</i> .....	38
6. T3SS DE SALMONELLA .....	38
a. <i>T3SS-1</i> .....	39
b. <i>T3SS-2</i> .....	40
7. REGULACIÓN DE LOS T3SS DE SALMONELLA .....	40
a. <i>Regulación del T3SS-1</i> .....	41
b. <i>Regulación del T3SS-2</i> .....	43
8. EFECTORES DE LOS T3SS DE SALMONELLA Y PROCESOS EN LOS QUE INTERVIENEN .....	44
a. <i>Endocitosis mediada por Salmonella</i> .....	49
b. <i>Alteración de las uniones estrechas</i> .....	51
c. <i>Respuestas nucleares</i> .....	52
d. <i>Biogénesis de la SCV y la proliferación intracelular de Salmonella</i> .....	53
e. <i>Muerte celular</i> .....	57
9. SLRP .....	59
10. EFECTORES SSEK.....	61
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>63</b>

<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>67</b>
1.1 <i>Estirpes bacterianas</i> .....	69
1.2 <i>Estirpes de levadura</i> .....	69
Congelación y descongelación de estirpes de levaduras .....	69
1.3 <i>Líneas de células de mamífero</i> .....	69
Congelación y descongelación de células de mamífero .....	70
<b>2. MEDIOS, SOLUCIONES Y CONDICIONES DE CULTIVO .....</b>	<b>70</b>
2.1 <i>Bacterias</i> .....	70
2.1.1 Condiciones de crecimiento bacteriano .....	70
2.1.2 Soluciones y medios para bacterias .....	70
2.2 <i>Levaduras</i> .....	71
2.2.1 Condiciones de cultivo de levaduras .....	71
2.2.2 Soluciones y medios para levaduras .....	71
2.3 <i>Líneas celulares de mamífero</i> .....	72
2.3.1 Condiciones de cultivo .....	72
2.3.2 Soluciones y medios de cultivo para células de mamífero .....	72
<b>3. MANIPULACIÓN Y TRANSFERENCIA DE ADN .....</b>	<b>73</b>
3.1 <i>Plásmidos</i> .....	73
3.2 <i>Extracción de ADN plasmídico</i> .....	74
3.2.1 Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> .....	74
3.2.2 Extracción de ADN plasmídico de <i>S. cerevisiae</i> .....	74
3.3 <i>Digestión y ligación de fragmentos de ADN</i> .....	75
3.4 <i>Electroforesis de ADN en gel de agarosa</i> .....	75
3.5 <i>Aislamiento de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa</i> .....	75
3.6 <i>Transformación de bacterias</i> .....	76
3.6.1 Transformación de <i>E. coli</i> quimiocompetentes .....	76
3.6.2 Electroporación de bacterias.....	76
3.7 <i>Transformación de levaduras</i> .....	77
3.7.1 Transformación de levaduras en medio sólido a partir de biomasa.....	77
3.7.2 Transformación de levaduras con genoteca en medio líquido .....	77
3.8 <i>Transfección de células de mamíferos</i> .....	78
3.8.1 Transfección de células HeLa.....	78
3.8.2 Transfección de células HEK293T .....	78
3.9 <i>Oligonucleótidos</i> .....	79
3.10 <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i> .....	80
3.11 <i>Mutagénesis puntual</i> .....	81
3.12 <i>Secuenciación</i> .....	82
3.13 <i>Análisis de secuencias</i> .....	82
<b>4. MANIPULACIÓN Y TRANSFERENCIA DE ARN .....</b>	<b>82</b>
4.1 <i>Extracción de ARN eucariota con TRIzol®</i> .....	82
4.2 <i>Limpieza del ARN mediante kit comercial</i> .....	83
4.3 <i>Análisis de la expresión génica por microarray</i> .....	83
4.4 <i>Análisis de ontología génica</i> .....	84
<b>5. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS .....</b>	<b>84</b>
5.1 <i>Preparación de extractos proteicos</i> .....	84
5.1.1 Extractos bacterianos para análisis en gel de poliacrilamida.....	84
5.1.2 Extractos de cultivos celulares humanos para análisis en gel de poliacrilamida .....	84
5.2 <i>Electroforesis en gel de poliacrilamida</i> .....	85
5.3 <i>Marcadores de peso molecular</i> .....	85
5.4 <i>Tinción de geles con azul de Coomassie</i> .....	85
5.5 <i>Inmunodetección de proteínas mediante Western Blot</i> .....	86



5.5.1	Transferencia a la membrana de nitrocelulosa .....	86
5.5.2	Tinción con Rojo <i>Ponceau</i> .....	86
5.5.3	Bloqueo de la membrana de nitrocelulosa .....	86
5.5.4	Incubación con anticuerpo primario .....	86
5.5.5	Incubación con el anticuerpo secundario .....	87
5.5.6	Detección de la señal .....	87
5.6	<b>Purificación de proteínas</b> .....	88
5.6.1	Purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad .....	88
5.6.2	Inmunoprecipitación de proteínas .....	89
5.7	<b>Cuantificación de proteínas</b> .....	89
6.	<b>ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA</b> .....	89
6.1	<i>Sistema del doble híbrido en levaduras</i> .....	89
6.2	<i>Copurificación por cromatografía de afinidad</i> .....	90
6.3	<i>Coinmunoprecipitación</i> .....	90
6.3.1	Coinmunoprecipitación de SseK1 y TBCB/ZBTB16 .....	90
6.3.2	Coinmunoprecipitación de TBCB modificada por SseK1 .....	91
7.	<b>ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA</b> .....	91
7.1	<i>Ensayo de actividad <math>\beta</math>-galactosidasa en levaduras</i> .....	91
7.2	<i>Ensayo de actividad transferasa de N-acetilglucosamina in vitro</i> .....	91
7.3	<i>Ensayo de ubicuilitación in vitro</i> .....	92
8.	<b>TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR</b> .....	92
8.1	<i>Infección de células epiteliales</i> .....	92
8.2	<i>Inmunofluorescencia y microscopía confocal</i> .....	93
9.	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	94
	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>95</b>
	<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>97</b>
	<b>ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE SSEK1 Y LAS PROTEÍNAS DIANA DEL HOSPEDADOR</b> .....	<b>97</b>
1.1	CONFIRMACIÓN DE LAS INTERACCIONES SSEK1-TBCB Y SSEK1-ZBTB16 .....	99
1.2	ACTIVIDAD CATALÍTICA DE SSEK1 EN ENSAYOS <i>IN VITRO</i> .....	101
1.3	ACTIVIDAD CATALÍTICA DE SSEK1 SOBRE LAS PROTEÍNAS DIANA EN EL HOSPEDADOR .....	104
1.4	ANÁLISIS DE OTROS EFECTORES DE LA FAMILIA DE SSEK1 .....	106
1.5	EFFECTO DE SSEK1 Y SSEK3 EN EL HOSPEDADOR .....	109
	<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>113</b>
	<b>IDENTIFICACIÓN DE SUSTRATOS POTENCIALES DE SLRP EN LA CÉLULA HOSPEDADORA</b> .....	<b>113</b>
2.1	EL SISTEMA DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS .....	115
2.2	DESCRIPCIÓN DE GENOTECA, FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN, ESTIRPE Y PLÁSMIDOS .....	116
2.2.1	<i>Genoteca</i> .....	116
2.2.2	<i>Factor de transcripción</i> .....	117
2.2.3	<i>Estirpe de S. cerevisiae</i> .....	117
2.2.4	<i>Plásmidos</i> .....	118
2.3	CONTROLES PREVIOS .....	118
2.4	ESCRUTINIO GENÉTICO .....	119
2.5	ENSAYO DE UBICUITILACIÓN DE SLRP SOBRE LOS CANDIDATOS DEL ESCRUTINIO GENÉTICO .....	125
	<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>129</b>
	<b>EFFECTO GLOBAL DE SLRP EN EL TRANSCRIPTOMA DE LA CÉLULA HOSPEDADORA</b> .....	<b>129</b>
3.1	CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA HACER EL <i>MICROARRAY</i> .....	131

3.2 OBTENCIÓN DE DATOS DEL <i>MICROARRAY</i> Y DESCRIPCIÓN DE LOS GENES .....	132
3.3 ANÁLISIS DE ONTOLOGÍA GÉNICA .....	134
3.4 ANÁLISIS DE RUTAS E INTERACCIONES DE LOS GENES IDENTIFICADOS .....	136
3.4.1 <i>Rutas y vías de señalización</i> .....	136
3.4.2 <i>Interacciones con otros genes y otras proteínas</i> .....	137
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>141</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>163</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>167</b>

# Índice de Figuras

---

FIGURA I.1. ESQUEMA DE LA CLASIFICACIÓN DEL GÉNERO <i>SALMONELLA</i> .....	24
FIGURA I.2. FILOGENIA DEL GÉNERO <i>SALMONELLA</i> .....	24
FIGURA I.3. PATOGÉNESIS DE LA INFECCIÓN POR <i>S. ENTERICA</i> .....	27
FIGURA I.5. ESQUEMA DE LOS PRINCIPALES SISTEMAS DE SECRECIÓN EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS .....	33
FIGURA I.6. COMPARACIÓN DEL COMPLEJO GANCHO-CUERPO BASAL DEL FLAGELO Y EL COMPLEJO AGUJA UTILIZADO EN LA SECRECIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA .....	35
FIGURA I.7. ESQUEMA DE LA ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LOS T3SS DE <i>SALMONELLA</i> .....	39
FIGURA I.8. REGULACIÓN DE LOS T3SS DE <i>SALMONELLA</i> .....	41
FIGURA I.9. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS T3SS DE <i>SALMONELLA</i> Y SUS EFECTORES .....	48
FIGURA I.10. ESTRATEGIAS DE ENTRADA DE <i>SALMONELLA</i> EN EL HOSPEDADOR.....	49
FIGURA I.11. CAMBIOS INDUCIDOS POR EL T3SS-1 EN LAS CÉLULAS HOSPEDADORAS.....	51
FIGURA I.12. RESPUESTAS NUCLEARES INDUCIDAS POR LOS EFECTORES DE <i>SALMONELLA</i> .....	53
FIGURA I.13. ETAPAS DE LA FORMACIÓN DE LA VACUOLA QUE CONTIENE A <i>SALMONELLA</i> .....	56
FIGURA I.14. MUERTE DE LA CÉLULA HOSPEDADORA INDUCIDA POR <i>SALMONELLA</i> .....	58
FIGURA I.15. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS DOMINIOS DE SLRP Y EFECTORES RELACIONADOS ....	60
FIGURA M.1. ETAPAS DEL PROGRAMA DE REACCIÓN PCR .....	81
FIGURA R.1.1. SSEK1 INTERACCIONA CON TBCB Y ZBTB16 EN BACTERIAS.....	100
FIGURA R.1.2. SSEK1 INTERACCIONA CON TBCB Y ZBTB16 EN LA CÉLULA HOSPEDADORA.....	101
FIGURA R.1.3. SSEK1 MODIFICA A TBCB <i>IN VITRO</i> .....	102
FIGURA R.1.4. ENSAYO <i>IN VITRO</i> CON DIFERENTES VARIANTES DE SSEK1 Y TBCB.....	103
FIGURA R.1.5. SSEK1 MODIFICA <i>IN VIVO</i> A TBCB PERO NO A ZBTB16.....	104
FIGURA R.1.6. CONFIRMACIÓN DE LA MODIFICACIÓN DE TBCB <i>IN VIVO</i> POR PARTE DE SSEK1.....	105
FIGURA R.1.7. INMUNOPRECIPITACIÓN DE TBCB <i>IN VIVO</i> Y ANÁLISIS DE SU MODIFICACIÓN .....	106
FIGURA R.1.8. ENSAYOS DE GLICOSILACIÓN DE TBCB <i>IN VITRO</i> CON SSEK2 Y SSEK3.....	107
FIGURA R.1.9. ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES DE LOS EFECTORES DE LA FAMILIA SSEK1 CON TBCB MEDIANTE EL SISTEMA DEL DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS.....	108
FIGURA R.1.10. ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES DE LOS MUTANTES CATALÍTICOS DE SSEK1 Y SSEK3 CON TBCB MEDIANTE EL SISTEMA DEL DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS .....	109
FIGURA R.1.11. MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA DE CÉLULAS HEK293T .....	111
FIGURA R.2.1. ESQUEMA DE LA BASE DEL SISTEMA DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS .....	116
FIGURA R.2.2. ESQUEMAS DE LOS VECTORES PLEX10 Y PGAD1318 .....	118
FIGURA R.2.3. CONTROLES PREVIOS DEL ENSAYO DE DOBLE HÍBRIDO.....	119
FIGURA R.2.4. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO SEGUIDO EN EL ESCRUTINIO .....	119
FIGURA R.2.5. ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES DE SLRP CON PROTEÍNAS HUMANAS MEDIANTE EL SISTEMA DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS .....	123
FIGURA R.2.6. ENSAYO DE UBICUITILACIÓN <i>IN VITRO</i> DE SNRPD2 Y TRX .....	127
FIGURA R.2.7. ENSAYO DE UBICUITILACIÓN <i>IN VITRO</i> Y PURIFICACIÓN POR AFINIDAD DE LOS POSIBLES SUSTRATOS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE SLRP .....	128
FIGURA R.3.1. CLASES DE PROTEÍNAS CODIFICADAS POR LOS GENES CON EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN PRESENCIA DE SLRP .....	123

FIGURA R.3.2. RESULTADOS OBTENIDOS CON EL PROGRAMA GENEMANIA SOBRE LOS GENES QUE VARÍAN SU EXPRESIÓN EN PRESENCIA DE SLRP .....	127
FIGURA R.3.3. RED INDIVIDUAL DE INTERACCIONES DE LOS GENES CON EXPRESIÓN DIFERENCIAL.....	128
FIGURA D.1. SECUENCIA AMINOACÍDICA DE LAS VERSIONES DE TBCB UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO .....	145
FIGURA D.2. ALINEAMIENTO DE EFECTORES CON ACTIVIDAD TRANSFERASA DE N-ACETILGLUCOSAMINA...	146
FIGURA D.3. ESQUEMA DE LOS PROCESOS GLOBALES QUE ENGLOBAN A LOS CANDIDATOS OBTENIDOS EN EL ESCRUTINIO MEDIANTE EL SISTEMA DE DOBLE HÍBRIDO .....	152

# Índice de tablas

---

TABLA I.1 LÍNAS CELULARES UTILIZADAS COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA INFECCIÓN POR <i>SALMONELLA</i> ..	28
TABLA I.2. EFECTORES DE LOS T3SS DE <i>SALMONELLA</i> .....	45
TABLA I.3. GENES HUMANOS IDENTIFICADOS EN EL ESCRUTINIO DE DOBLE HÍBRIDO CON SSEK1.....	62
TABLA M.1. ESTIRPES BACTERIANAS USADAS EN ESTA TESIS .....	69
TABLA M.2. CONCENTRACIÓN FINAL DE ANTIBIÓTICOS Y OTROS COMPUESTOS QUÍMICOS UTILIZADOS EN LOS MEDIOS DE CULTIVO BACTERIANOS.....	71
TABLA M.3. SUPLEMENTOS PARA EL MEDIO MÍNIMO DE LEVADURAS.....	72
TABLA M.4. PLÁSMIDOS UTILIZADOS EN ESTA TESIS.....	73
TABLA M.5. OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO .....	79
TABLA M.6. COMPONENTES DE LA REACCIÓN PCR Y VOLÚMENES NECESARIOS PARA UNA REACCIÓN DE 50 µL .....	80
TABLA M.7. ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA LA DETECCIÓN DE PROTEÍNAS .....	87
TABLA R.2.1. GENES HUMANOS IDENTIFICADOS EN EL ESCRUTINIO DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS CON SLRP .....	120
TABLA R.2.2: ANÁLISIS DE ONTOLOGÍA GÉNICA DE LOS CANDIDATOS OBTENIDOS EN EL ESCRUTINIO DE DOBLE HÍBRIDO CON SLRP .....	124
TABLA R.3.1. GENES CON EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN PRESENCIA DE SLRP EN INFECCIONES DE CÉLULAS HELA .....	132
TABLA R.3.2. DESCRIPCIÓN DE LOS GENES CON EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN PRESENCIA DE SLRP EN INFECCIONES .....	133
TABLA R.3.3. ANÁLISIS DE ONTOLOGÍA GÉNICA DE LOS GENES CON EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN PRESENCIA DE SLRP DURANTE LA INFECCIÓN DE CÉLULAS HELA.....	135
TABLA R.3.4. RUTAS EN LAS QUE SE ENCUENTRA IMPLICADO CADA GEN CON EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN PRESENCIA DE SLRP EN INFECCIONES .....	137



# Listado de abreviaturas

---

<b>6His</b>	6 histidinas
<b>AD</b>	Dominio de activación del factor de transcripción Gal4
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>Ap</b>	Ampicilina (Ap <sup>r</sup> : resistente a ampicilina)
<b>ArgGlcNAc</b>	Residuo de arginina glicosilado con N-Acetilglucosamina
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>BD</b>	Dominio de unión al ADN del factor bacteriano LexA
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino ( <i>bovine serum albumin</i> )
<b>C-terminal</b>	Carboxilo terminal
<b>CABIMER</b>	Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa
<b>Cm</b>	Cloranfenicol (Cm <sup>r</sup> : resistente a cloranfenicol)
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleósidos trifosfato
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>FADD</b>	<i>FAS-associated death domain protein</i>
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino ( <i>fetal bovine serum</i> )
<b>FDR</b>	<i>False discovery rate</i>
<b>GAP</b>	Proteína activadora de GTPasas ( <i>GTPase activator protein</i> )
<b>GEF</b>	Factor de recambio de nucleótidos de guanina ( <i>guanine exchange factor</i> )
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente ( <i>green fluorescent protein</i> )
<b>Gm</b>	Gentamicina
<b>GO</b>	<i>Gene Ontology</i>
<b>GST</b>	Glutación S transferasa
<b>HA</b>	Hemaglutinina
<b>H<sub>2</sub>O<sub>d</sub></b>	Agua destilada
<b>H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub></b>	Agua bidestilada

<b>IF</b>	Inmunofluorescencia
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>IP</b>	Inmunoprecipitación
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido
<b>Km</b>	Kanamicina ( $Km^r$ : resistente a kanamicina)
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>LNT</b>	LAMP1- <i>negative tubule</i>
<b>Lrp</b>	<i>Leucine-responsive regulatory protein</i>
<b>LRR</b>	Repeticiones de un motivo rico en leucina ( <i>leucine rich repeat</i> )
<b>MAPK</b>	Proteína kinasa activada por mitógenos ( <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> )
<b>MCS</b>	Sitio de clonación múltiple ( <i>multi-cloning site</i> )
<b>ME</b>	Membrana externa
<b>MEC</b>	Medio extracelular
<b>MI</b>	Membrana interna
<b>Min</b>	Minuto
<b>MOI</b>	Multiplicidad de infección
<b>MP</b>	Membrana plasmática
<b>N-terminal</b>	Amino terminal
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>NEL</b>	<i>Novel E3 ligase</i>
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear $\kappa$ B
<b>Ni-NTA</b>	Ácido nitrilotriacético con níquel
<b>NP40</b>	Nonidet P-40
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino ( <i>phosphate buffer saline</i> )
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>PMN</b>	Leucocitos polimorfonucleares
<b>PMSF</b>	Fenilmetilsulfonil fluoruro
<b>qRT-PCR</b>	PCR cuantitativa a tiempo real
<b>RNI</b>	Intermediarios reactivos de nitrógeno
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>SB</b>	Tampón de la muestra de Laemmli
<b>SCV</b>	Vacuola que contiene a <i>Salmonella</i> ( <i>Salmonella containing vacuole</i> )
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS ( <i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
<b>Sif</b>	Filamentos inducidos por <i>Salmonella</i> ( <i>Salmonella-induced filament</i> )



<b>SIST</b>	<i>Salmonella-induced tubule</i>
<b>SPI</b>	Isla patogenicidad <i>Salmonella</i> ( <i>Salmonella pathogenicity island</i> )
<b>SV</b>	<i>Salmonella</i> Sevilla
<b>Tc</b>	Tetraciclina (Tc <sup>r</sup> : resistente a tetraciclina)
<b>TFB</b>	Tampón de transformación
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral ( <i>tumor necrosis factor</i> )
<b>TRADD</b>	<i>TNFR1-associated death domain protein</i>
<b>TxSS</b>	Sistema de secreción tipo x ( <i>type-x secretion system</i> )
<b>U</b>	Unidad
<b>Ub</b>	Ubiquitina
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>WB</b>	<i>Western blot</i>
<b>Wt</b>	Silvestre
<b>X-Gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\alpha$ -D-galactopiranosido



# Resumen

---

*Salmonella enterica* es una especie de bacteria patógena Gram negativa que puede producir diferentes enfermedades, desde gastroenteritis a enfermedades sistémicas. *S. enterica* posee dos sistemas de secreción de tipo III (T3SS), relacionados con la virulencia e imprescindibles en la interacción con la célula hospedadora. Estos sistemas median la translocación de proteínas efectoras al citosol de la célula hospedadora, donde causan alteraciones en los procesos y vías de señalización celulares, permitiendo la entrada del patógeno y su supervivencia en el interior celular. En esta Tesis nos hemos centrado en el estudio de dos efectores de los T3SS de *Salmonella*: SseK1 y SlrP, de sus posibles sustratos en la célula hospedadora y las consecuencias de su función biológica durante la infección.

En la primera parte de esta Tesis, se profundizó en el estudio de la interacción de SseK1 con dos proteínas humanas (TBCB y ZBTB16), detectadas en un escrutinio genético realizado previamente en nuestro laboratorio. TBCB pertenece a una familia de proteínas que controlan la formación de dímeros de tubulina, mientras que ZBTB16 es un factor de transcripción de la familia de las proteínas de dedos de zinc. Las interacciones fueron validadas mediante técnicas independientes y, posteriormente, se identificó que el efector SseK3, de la misma familia de efectores que SseK1, también interactúa con TBCB. Además, se demostró que TBCB es sustrato de la actividad transferasa de N-acetilglucosamina de SseK1. Sobre la base de estos resultados y de la función de TBCB, se estudió el efecto de SseK1 y SseK3 sobre los microtúbulos de la célula hospedadora, observándose diferencias en la acetilación de los microtúbulos en presencia de estos efectores de *Salmonella*.

El resto del trabajo se centró en el estudio del efector SlrP. Debido al éxito cosechado en el escrutinio realizado anteriormente con SseK1, se realizó un nuevo escrutinio mediante la técnica del doble híbrido en levaduras para encontrar proteínas de la célula hospedadora capaces de interactuar con SlrP. Se detectaron interacciones con 31 proteínas humanas diferentes, confirmándose 16 de ellas. Además, se analizó la ontología génica de los candidatos confirmados y se realizó un ensayo de ubicuilitación *in vitro* con los más prometedores, confirmándose que SNRPD2 es sustrato de la actividad ligasa de ubiquitina de SlrP.

En la última parte de esta Tesis, se aborda el papel biológico del efector SlrP en un contexto lo más cercano posible a la realidad de la infección. Mediante un análisis transcriptómico comparativo de células infectadas con *Salmonella* y células infectadas con un mutante con expresión nula de *slrP*, se identificaron una serie de genes humanos cuya expresión era activada o reprimida por la presencia de SlrP. Estos genes se sometieron a un análisis exhaustivo de ontología génica, junto a la señalización y procesos celulares en que se encuentran implicados, para valorar de forma global el impacto de SlrP en la célula hospedadora.



# Introducción

---



## 1. EL GÉNERO SALMONELLA

*Salmonella* es un género de bacterias constituido por bacilos móviles Gram negativos, y representan un grupo de bacterias patógenas intracelulares facultativas, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. *Salmonella* es un género estrechamente relacionado con otros como *Escherichia*, *Shigella* y *Citrobacter* y, de hecho, la organización genómica de *Salmonella* y *E. coli* es similar (Groisman and Ochman, 1994; Sanderson et al., 1995). *E. coli* no patogénica y *S. enterica* serovar Typhimurium alcanzan un 80% de similitud en sus secuencias (Blattner et al., 1997; McClelland et al., 2001), aunque *Salmonella* además contiene específicamente otras regiones en el genoma que están ausentes en géneros relacionados.

Dentro del género *Salmonella*, encontramos dos especies: *S. bongori* y *S. enterica* (Tindall et al., 2005), las cuales tienen una similitud entre sus secuencias genómicas entre el 96 y el 99% (Edwards et al., 2002). Asimismo, *S. enterica* se puede subdividir en seis subespecies: I (*enterica*), II (*salamae*), IIIa (*arizonae*), IIIb (*diarizonae*), IV (*houtenae*) y VI (*indica*) (Desai et al., 2013; Porwollik et al., 2004; Tindall et al., 2005). Las subespecies de *S. enterica* II, IIIa, IIIb, IV y VI, además de *S. bongori*, se encuentran asociadas a vertebrados de sangre fría; por otra parte, los miembros que pertenecen a la subespecie I de *S. enterica* se encuentran con mayor frecuencia asociados a aves y mamíferos (Bäumler et al., 1998; Boyd et al., 1996).

Por último, los miembros de cada subespecie de *S. enterica* pueden clasificarse en serovares (o serotipos). Existen más de 2500 serovariedades descritas en total (Popoff et al., 2004), aunque la mayor parte de serovares, más de 2300, se corresponden con la subespecie I (Porwollik et al., 2004). Los serovares se pueden distinguir entre sí mediante pruebas inmunológicas, en las que se utilizan antisueros para detectar los antígenos O y H. En estos antígenos se refleja que la parte que se expone del lipopolisacárido tiene una gran variabilidad, así como la flagelina (Grimont et al., 2007; McQuiston et al., 2004).

El espectro de hospedadores que infecta cada serovar de *S. enterica* y la sintomatología que causa pueden llegar a ser totalmente diferentes: desde infecciones asintomáticas y diarrea leve, hasta una enfermedad sistémica severa que puede desembocar en la muerte del hospedador. Además, se puede distinguir entre serovares que infectan a un espectro bastante amplio de hospedadores, como es el caso de *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*), que puede colonizar a humanos, varios animales de granja e incluso roedores; mientras que otros serovares son específicos de un número reducido de hospedadores, como ocurre con *S. enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*), que sólo causa enfermedad en humanos y primates superiores. En la **Figura I.1** se muestra un esquema representativo del género *Salmonella*.

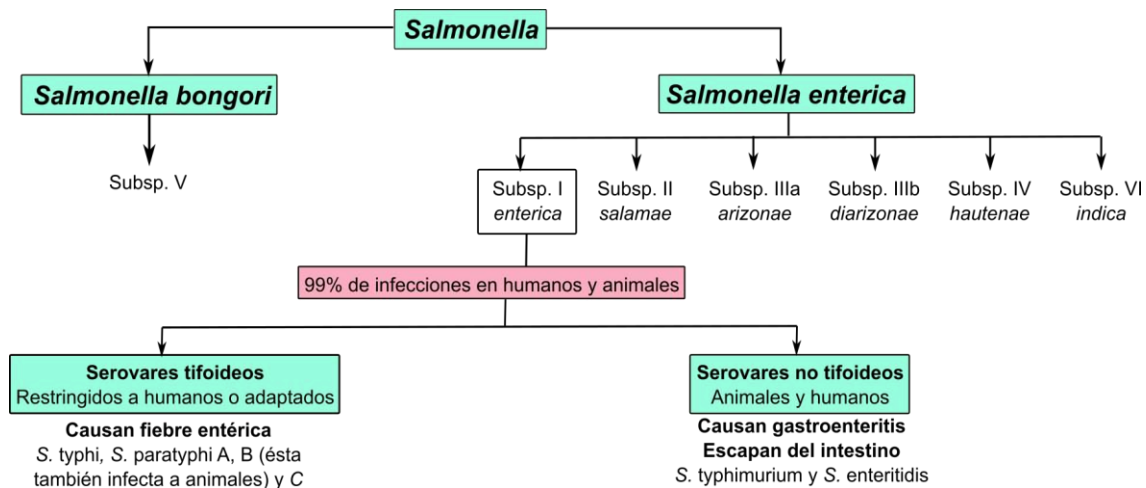


Figura I.1. Esquema de la clasificación del género *Salmonella*. Imagen modificada de (Akyala and Alsam, 2015)

## 2. EVOLUCIÓN DE *SALMONELLA* Y SU PATOGENICIDAD

El género *Salmonella* y *Escherichia* divergieron hace 120-160 millones de años (Ochman and Wilson, 1987) y, de hecho, la principal diferencia entre los genomas de ambos radica en el material genético que contiene *Salmonella* y del que carece *E. coli* (McClelland et al., 2001; Porwollik and McClelland, 2003). La evolución de la patogenicidad de *Salmonella* está estrechamente relacionada con la adquisición gradual de genes de virulencia, agrupándose la mayoría de ellos en las islas de patogenicidad (SPI, del inglés *Salmonella Pathogenicity Island*) (Groisman and Ochman, 1997; Kelly et al., 2009). El hecho de que estas regiones no aparezcan en el cromosoma de otros integrantes de la familia *Enterobacteriaceae*, y que tengan un porcentaje de contenido en G+C diferente al resto del material genético de *Salmonella*, sugiere la posibilidad de que se hubiesen adquirido mediante transferencia horizontal (Kelly et al., 2009; Porwollik and McClelland, 2003).

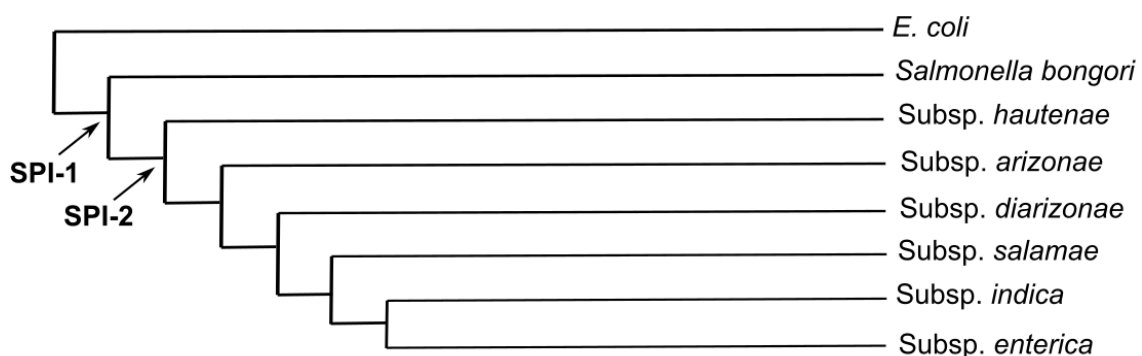


Figura I.2. Filogenia del género *Salmonella*. Se indican los eventos de adquisición de las islas de patogenicidad SPI-1 y SPI-2. Modificado de (Dworkin and Falkow, 2006).

Las islas de patogenicidad mejor caracterizadas de *Salmonella* son SPI-1 y SPI-2, cuya adquisición se representa dentro del contexto de la filogenia de esta bacteria en la **Figura I.2**. La SPI-1 se adquirió primero por el ancestro que tienen en común las dos especies de *Salmonella*, y su implicación principal en la infección se produce en la invasión del hospedador,



concretamente de las células epiteliales del intestino (Que et al., 2013). La incorporación de la SPI-1 al genoma de *Salmonella* probablemente permitió a la bacteria convertirse en un patógeno intracelular de vertebrados de sangre fría (Dworkin and Falkow, 2006). Posteriormente, la adquisición de la SPI-2, que permite la supervivencia de *Salmonella* en macrófagos y la colonización de otros tejidos (Wood et al., 1998), causó la divergencia entre las dos especies de *Salmonella* (Dworkin and Falkow, 2006). Así, sólo *S. enterica* tiene la capacidad de alcanzar ciertos tejidos y órganos para causar infecciones sistémicas.

Con el paso de los años, los ancestros de la subespecie *enterica* de *Salmonella* consiguieron infectar a vertebrados de sangre caliente, mediante un mecanismo que sigue siendo un misterio. Las diferentes estirpes evolucionaron para ir colonizando una gran variedad de hospedadores. A pesar de que los mecanismos que determinan la especificidad de hospedador no están completamente definidos, la presencia del plásmido de virulencia en algunos serovares de *S. enterica* indica que podría ser importante en este sentido (Bäumler et al., 1998). Del mismo modo, otro factor que podría estar implicado en la especificidad del hospedador es el perfil de los diferentes operones que codifican fimbrias en los distintos serovares (Bäumler et al., 1998; Humphries et al., 2001).

### 3. PROCESO DE INFECCIÓN POR *S. ENTERICA*

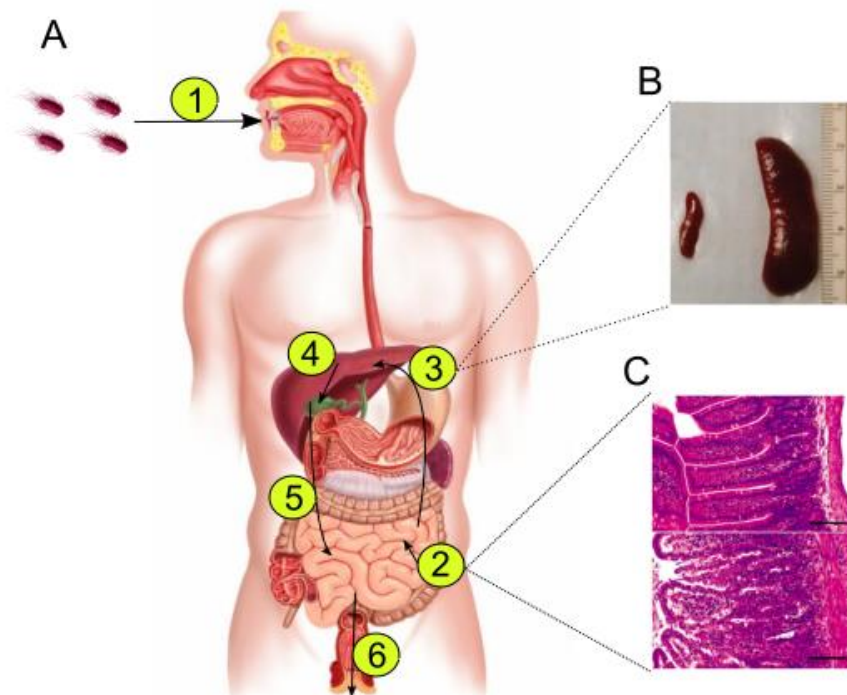
Una de las principales enfermedades sistémicas causadas por *Salmonella* en humanos se denomina fiebre tifoidea, producidas concretamente por los serovares Typhi y Paratyphi. Se pueden encontrar diferentes síntomas que manifiestan esta enfermedad, como diarrea transitoria o estreñimiento, fiebre y dolor abdominal. Incluso, en ocasiones, erupciones maculopapulares. A comienzos de 2018, la Organización Mundial de la Salud estimó que el número de personas que padecen fiebre tifoidea en todo el mundo asciende a una cifra de entre 11 y 20 millones al año, llegando a causar alrededor de 150.000 muertes. La fiebre tifoidea es una enfermedad que se extiende principalmente en países con escaso desarrollo, a causa de las deficiencias en sus condiciones sanitarias, como la ausencia de agua potable y a unas condiciones poco o nada higiénicas respecto a la manipulación y conservación de alimentos. *S. Typhi* causa una infección persistente en la vesícula biliar en alrededor del 1-4% de los pacientes tifoideos (Parry et al., 2002). Estos portadores son asintomáticos pero perpetúan el problema porque liberan un gran número de bacterias en sus heces, y de este modo se mantiene a largo plazo *S. Typhi* en la población humana (Tischler and McKinney, 2010).

También hay otros factores muy relevantes para que se desarrolle una infección crónica, como la presencia de algún tipo de anomalía en la vesícula biliar o en el conducto. Es el caso de los cálculos biliares. Hay datos disponibles que apuntan a que los cálculos presentes en la vesícula suponen un nicho sobre los cuales *Salmonella* puede formar *biofilms*. Mediante este mecanismo, también se contribuye a que estas infecciones acaben estableciéndose de forma crónica (Crawford et al., 2010), haciendo ineficaz el uso de antibióticos en la mayoría de casos (Dutta et al., 2000; Lai et al., 1992). De este modo, se acaba haciendo necesaria la extirpación de la vesícula biliar para eliminar la infección crónica.

Por otra parte, también se producen anualmente millones de casos de salmonelosis no tifoidea, cuyos principales causantes son los serovares Enteritidis y Typhimurium. Estos serovares causan en los seres humanos diferentes grados de gastroenteritis, desde leves hasta muy graves. Habitualmente no se necesitan tratamientos para que remita esta gastroenteritis. También infectan a todo tipo de animales domésticos (entre los que se incluyen cerdos, ganado vacuno o aves) y puede causarles infecciones de gravedad variable: desde asintomáticas a sistémicas.

En el África subsahariana son frecuentes las salmonelosis no tifoideas complicadas con bacteriemia (De Wit et al., 1988; Morpeth et al., 2009). Además, su incidencia aumenta cuando se asocia con las infecciones por VIH y por *Plasmodium falciparum* (Bronzan et al., 2007). Ciertos serovares no tifoideos de *Salmonella* también pueden causar colecistitis persistente o crónica (Lalitha and John, 1994). Estas últimas infecciones persistentes son difíciles de erradicar, por lo que la solución final acaba siendo de nuevo la extirpación de la vesícula biliar.

En la **Figura I.3** se representan todas las etapas de la patogénesis causada por *Salmonella* en humanos. El proceso de infección por *Salmonella* comienza cuando se ingiere agua contaminada o alimentos mal procesados, generalmente crudos o poco cocinados. *Salmonella* es capaz de sobrevivir a la acidez que se establece en el ambiente del estómago, producido por los jugos gástricos. También puede escapar a las defensas del intestino delgado, para alcanzar finalmente las células epiteliales. Y es en el epitelio donde *Salmonella* comienza su invasión, preferentemente a través de las células M, para posteriormente acceder a las células linfoides B y T, que se encuentran bajo las placas de Peyer. Una vez ha atravesado el epitelio, pueden ocurrir dos sucesos según el serovar de *Salmonella*: los serovares que producen enfermedad sistémica entran en macrófagos intestinales y se diseminan por el organismo. Por otra parte, los serovares no tifoideos desencadenan una respuesta inflamatoria en una etapa temprana y muy localizada. Esta respuesta induce la infiltración de leucocitos polimorfonucleares (PMN) al lumen intestinal, provocando diarrea (Haraga et al., 2008).



**Figura I.3. Patogénesis de la infección por *S. enterica*.** (A) La infección comienza tras la ingestión de comida o agua contaminadas con *S. Typhi* (1). Las bacterias que sobreviven atraviesan la barrera de ácido gástrico del estómago, invaden las células del intestino y migran a través de ellas para alcanzar la lámina propia (2). En la mucosa intestinal, *S. Typhi* es fagocitada por macrófagos y sobrevive en estas células fagocíticas gracias a factores de virulencia, los cuales interfieren con las funciones de la célula hospedadora. Tras la invasión, el patógeno intracelular expresa otros factores que inhiben la detección por parte del sistema inmune innato del hospedador. Esto permite a las bacterias diseminarse sistémicamente para colonizar macrófagos del hígado, bazo y médula ósea (3). Desde el hígado, las bacterias pueden alcanzar la vesícula biliar (de color verde en la representación). La infección de la vesícula biliar puede dar lugar a la conversión a un estado de portador asintomático (4). Los portadores de *S. Typhi* continuamente descargan bacilos tifoideos desde la vesícula biliar al intestino delgado mediante la bilis (5) y excretan bacterias viables en sus heces (6), que pueden infectar a otros hospedadores. Imagen adaptada de (Tischler and McKinney, 2010). (B) Se muestra el bazo de un ratón 129sv sin infectar (izquierda) y el bazo con esplenomegalia de un ratón 129sv infectado con *S. Typhimurium* SL1344 durante 60 días (imagen adaptada de (Monack et al., 2004)). (C) Secciones histológicas de íleon de ratón teñidas con hematoxilina y eosina (barra de escala: 100  $\mu$ m). La imagen superior corresponde a un control sin infectar; la imagen inferior corresponde al íleon de un ratón BALB/c tras 5 días de infección con una dosis letal de *S. Typhimurium* 14028 (Santos et al., 2001)

#### a. Modelo de líneas celulares para el estudio de la virulencia de *Salmonella*

El hecho de que *S. Typhimurium* pueda infectar a una gran variedad de hospedadores hacen que sea uno de los organismos modelo que más se ha utilizado a la hora de estudiar infecciones causadas por el género *Salmonella*. Puede utilizarse con modelos *in vivo*, pero también *in vitro*, ya que hay disponible numerosas líneas celulares eucarióticas que pueden emplearse como modelos en el estudio de la supervivencia o proliferación intracelulares. Cada una de las líneas celulares modelo utilizadas para el estudio de la infección causada por *Salmonella* tiene unas características específicas, como se indica en la **Tabla I.1**. El método que se emplea de forma más habitual para estos estudios *in vitro* es el de la protección frente a gentamicina (Gm). La gentamicina es un antibiótico que tiene gran dificultad para atravesar la membrana de las células eucariotas (Elsinghorst, 1994), de modo que cuando se realiza una

infección *in vitro*, con el tratamiento con gentamicina las bacterias que han accedido al interior del hospedador quedan intactas, pero las bacterias extracelulares se eliminan.

**Tabla I.1 Líneas celulares utilizadas como modelo de estudio de la infección por *Salmonella*.** Modificada de (Garai et al., 2012).

Tipo celular	Cultivo celular modelo	Modo de internalización	Salida
<b>Células M</b>	Cultivo mixto de células CaCo-1 y Raji B	Endocitosis mediada por caveolas	Lisis celular
<b>Células dendríticas</b>	Células primarias	Fagocitosis	Apoptosis, lisis celular
<b>Macrófagos</b>	RAW264.7, J774, etc. y células primarias	Fagocitosis	Apoptosis
<b>Células epiteliales</b>	HeLa, HEK293.T, CaCo-2, INT-407, etc. y células primarias	Macropinocitosis	Apoptosis, lisis celular
<b>Fibroblastos</b>	NRK-49F, 3T3	Macropinocitosis	Apoptosis, lisis celular

#### 4. FACTORES DE VIRULENCIA DE *SALMONELLA*

Se han propuesto cuatro mecanismos genéticos que explican las diferencias fenotípicas entre especies bacterianas relacionadas, como *E. coli* y *S. enterica*, las cuales difieren en su potencial patogénico: (i) la presencia de genes de virulencia específicos; (ii) la ausencia en las especies patógenas de un gen supresor de virulencia que inhiba o interfiera con la actividad de los factores de virulencia, como ocurre en el caso de la pérdida del operón *lac* en *Salmonella* (Eswarappa et al., 2009); (iii) la existencia de diferencias alélicas entre genes homólogos; y (iv) la regulación diferencial de secuencias homólogas (Groisman and Ochman, 1994).

Tal y como se ha indicado antes, las SPI contienen grupos de genes cromosómicos que codifican funciones de virulencia de los patógenos y, además, están ausentes en las especies no patógenas relacionadas (Dobrindt et al., 2004). Por ejemplo, *Salmonella* contiene distintas SPI que le confieren la habilidad para invadir células epiteliales y sobrevivir dentro de células fagocíticas. Estas islas están ausentes en la *E. coli* comensal, la cual no invade ni puede sobrevivir en células de mamífero, mientras que para algunos serovares de *S. enterica* se han identificado al menos 21 SPI (Sabbagh et al., 2010).

Se han detectado varios indicadores que apoyan la hipótesis de que las regiones SPI se han adquirido mediante procesos de transferencia horizontal: (i) contenido de un porcentaje en G+C distinto al resto del genoma; (ii) las regiones SPI están acotadas por genes que se sitúan contiguos en especies no patógenas pero que evolutivamente se encuentran cercanas; y (iii) en ocasiones, en los extremos se encuentran secuencias homólogas a algunos elementos de inserción, así como transposones y profagos, lo que secunda la posibilidad de que actúe un mecanismo de adquisición (Groisman and Ochman, 1997; Hacker and Kaper, 2000).

Además de las SPI, también hay otras regiones específicas de *Salmonella* relacionadas con la virulencia. Éstas son de un tamaño menor y se conocen como 'islotos de patogenicidad' (Groisman and Ochman, 1997). También existen genes de patogenicidad asociados a profagos (Figuroa-Bossi et al., 2001); y por último, podemos encontrar el 'plásmido de virulencia', el

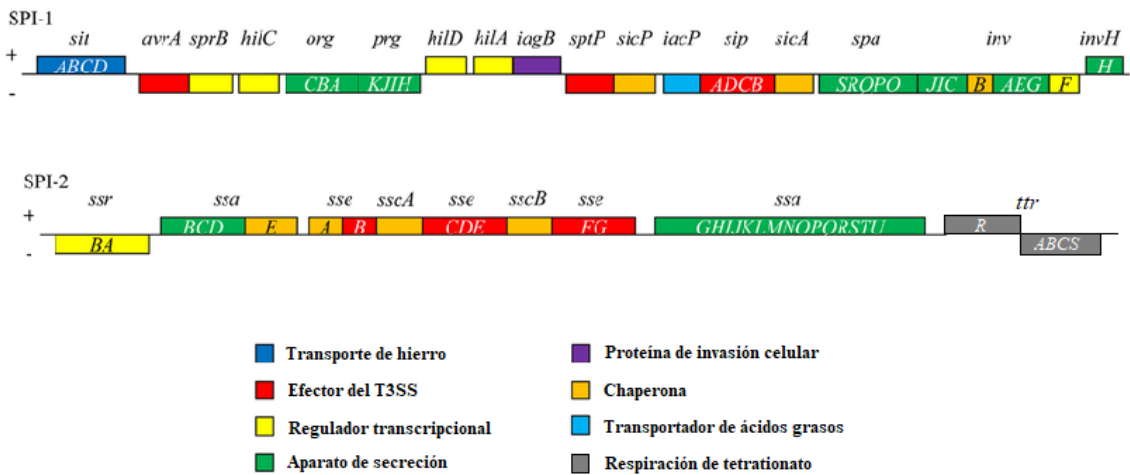
cual sólo está presente en ciertos miembros del género *Salmonella*. Tiene un tamaño que oscila entre 50 y 90 kb, aunque sólo una región de 7'8 kb denominada *spv* (*Salmonella plasmid virulence*) es relevante para la infección sistémica (Casadesús, 1999; Gulig et al., 1993).

#### a. *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1)

La SPI-1 tiene un papel fundamental tanto en el desarrollo de la gastroenteritis como en la infección sistémica causada por *Salmonella* (Hansen-Wester and Hensel, 2001). La SPI-1 codifica un sistema de secreción tipo III (T3SS-1), un aparato de virulencia necesario para la infección, a través del cual el patógeno inyecta proteínas efectoras directamente al citoplasma de la célula hospedadora. La SPI-1 interviene en múltiples procesos, tales como citotoxicidad en macrófagos (Chen et al., 1996), invasión de células epiteliales (Galán, 1999), inflamación y secreción de fluidos en el íleon (Galyov et al., 1997), secreción de citoquinas (Galán, 2001; Hobbie et al., 1997) y prevención de la apoptosis en células epiteliales (Knodler et al., 2005).

#### b. *Salmonella* Pathogenicity Island 2 (SPI-2)

De forma similar a lo que sucede con la SPI-1, la SPI-2 también codifica un sistema de secreción tipo III (T3SS-2) importante para la virulencia de *Salmonella*. Las proteínas codificadas en la SPI-2 no están implicadas en la gastroenteritis, pero siguen siendo fundamentales para la infección sistémica de *Salmonella*. Esto se debe a que son imprescindibles para la supervivencia intracelular del patógeno dentro de las células hospedadoras. La formación y el mantenimiento de la vacuola que contiene a *Salmonella* (SCV o *Salmonella containing vacuole*) conllevan una serie de actuaciones que están controladas por esta isla de patogenicidad (Haraga et al., 2008). La SPI-2 confiere protección frente a especies reactivas de oxígeno o ROS, así como a intermediarios reactivos de nitrógeno o RNI dentro de macrófagos (Chakravorty et al., 2002; Janssen et al., 2003). También se codifica en la SPI-2 la reductasa de tetracionato, la cual actúa sobre el tetracionato para generar tiosulfato. El tiosulfato ejerce como donador de electrones alternativo para *Salmonella* en ambientes que contienen tetracionato, como el intestino humano, el suelo o cadáveres en descomposición (Hensel et al., 1999; Winter et al., 2010). En la **Figura I.4** se muestran, de forma resumida, los diferentes componentes genéticos tanto de la SPI-1 como de la SPI-2.



**Figura I.4 Esquema de los genes que forman parte de las islas SPI-1 y SPI-2.** Adaptado de (Hurley et al., 2014; V and M, 2004).

A pesar de que las funciones de SPI-1 y SPI-2 sean relevantes en diferentes momentos de la infección por parte de *Salmonella* y por tanto cabría esperar que su expresión no fuese simultánea, existen pruebas de solapamiento espaciotemporal en la expresión de ambas islas (Moest and Méresse, 2013). Por ejemplo, la SPI-2 se expresa en el lumen del intestino de forma previa a la invasión de las células epiteliales por parte de *Salmonella*, con la finalidad de preparar al patógeno para atravesar el lado basal del epitelio hasta la lámina propia y para el inminente estrés intracelular (Brown et al., 2005; Müller et al., 2012). También se ha descrito la expresión residual de la SPI-1 tras la internalización de *Salmonella* por macrófagos, para contrarrestar la respuesta inmune del hospedador mediante la supresión de la expresión de citoquinas (Pavlova et al., 2011).

### c. Otras islas de patogenicidad

La gran mayoría de las 21 SPI identificadas en *S. enterica* (Sabbagh et al., 2010) se encuentran en los serovares Typhi y Typhimurium. Si atendemos específicamente a estos dos serovares, podemos observar que:

- 11 SPI son comunes al serovar Typhi y al serovar Typhimurium (SPI-1 a 6, SPI-9, SPI-11, SPI-12, SPI-13 y SPI-16).
- SPI-14 es específica del serovar Typhimurium.
- Otras 6 SPI son específicas del serovar Typhi (SPI-7, SPI-8, SPI-10, SPI-15, SPI-17 y SPI-18). Sin embargo, SPI-8 y SPI-10 tienen regiones equivalentes en *S. Typhimurium*, aunque con genes completamente distintos.
- SPI-19, SPI-20 y SPI-21 se encuentran en serovares diferentes a Typhi y Tyhimurium

Aunque SPI-1 y SPI-2 son las islas con un papel más destacado a lo largo de la infección por parte de *Salmonella* y su propagación por el hospedador, hay más islas de patogenicidad que participan en diferentes procesos asociados:

- **SPI-3:** codifica la proteína MgtC, que permite a *Salmonella* sobrevivir en condiciones de bajo  $Mg^{2+}$ . Esta isla es necesaria para la supervivencia de la bacteria dentro de macrófagos, así como para la infección sistémica en el modelo de ratón (Blanc-Potard et al., 1999).
- **SPI-4:** codifica un sistema de secreción de tipo I (T1SS) que secreta una adhesina llamada SiiE, contribuyendo a la virulencia de *Salmonella* (Kiss et al., 2007; Morgan et al., 2007).
- **SPI-5:** da lugar a los efectores SopB y PipB, los cuales se translocan por los sistemas de secreción de tipo III de *Salmonella* codificados en la SPI-1 (T3SS-1) y en la SPI-2 (T3SS-2), respectivamente (Knodler et al., 2002).
- **SPI-6:** codifica un sistema de secreción de tipo VI (T6SS), una fimbria y una invasina (Lambert and Smith, 2008; Townsend et al., 2001). El T6SS puede reprimirse por la proteína H-NS y se ha descrito su implicación en la competición entre subpoblaciones de *S. enterica* durante la infección (Brunet et al., 2015).
- **SPI-7:** esta isla de patogenicidad es la mayor identificada hasta el momento, con 134 kb. Tiene como función principal la síntesis y secreción del antígeno Vi. Además, contiene los genes que codifican el efector SopE (secretado por el T3SS-1) y el pilus tipo IV-B (Seth-Smith, 2008). SPI-7, a pesar de su tamaño, es un ejemplo de isla de patogenicidad escindible por recombinación específica de sitio (Nieto et al., 2016).
- **SPI-8:** codifica dos proteínas de inmunidad frente a bacteriocinas en *S. Typhi* (Parkhill et al., 2001).
- **SPI-9:** codifica un T1SS parecido al que se produce en SPI-4 (Parkhill et al., 2001).
- **SPI-10:** está presente en *S. Typhi*, y contiene un profago denominado ST46 (Parkhill et al., 2001). Este profago es portador de genes que codifican quinasas y fosfatasa de serina/treonina de tipo eucariótico, las cuales están implicadas en la supervivencia del patógeno en macrófagos (Faucher et al., 2008).
- **SPI-11:** contiene los genes *pagD* y *pagC*, que se activan por PhoP, y están implicados en la supervivencia de *Salmonella* en macrófagos (Gunn et al., 1995).
- **SPI-12:** codifica el efector SspH2 (Miao et al., 1999).
- **SPI-14:** contiene genes cuya expresión aumenta en macrófagos (Eriksson et al., 2003).
- **SPI-15, SPI-16 y SPI-17** fueron identificados mediante técnicas de bioinformática (Vernikos and Parkhill, 2006). SPI-15 se sitúa junto al gen del ARNt *glyU*, y codifica proteínas hipotéticas (Vernikos and Parkhill, 2006). SPI-16 codifica proteínas con un alto grado de identidad con las del fago P22, y está implicado en la seroconversión y la colonización intestinal a largo plazo (Ilyas et al., 2017). SPI-17 se sitúa al lado de otro gen de ARNt, *argW*, y los genes que lo componen también presentan homología con genes de P22 (Sabbagh et al., 2010)
- **SPI-18:** contiene el gen *hlyE*, que codifica una hemolisina implicada en la invasión de células epiteliales y colonización de órganos en ratones (Fuentes et al., 2008).
- **SPI-19, SPI-20 Y SPI-21:** codifican diversos T6SS que se encuentran en otros serovares distintos a *Typhi* y *Typhimurium* (Blondel et al., 2009).

#### d. Plásmido de virulencia

Algunas especies del género *Salmonella* tienen un plásmido de bajo número de copias, cuyo tamaño oscila entre las 50 y las 90 kb, que es necesario para la infección sistémica. Este plásmido posee una región específica denominada *spv* (del inglés *Salmonella plasmid virulence*) que es la requerida para conferir el fenotipo de virulencia en ratones BALB/c (Casadesús, 1999; Gulig et al., 1993). En esta región se encuentran los genes *spv*, cuyos productos se secretan a través de los T3SS y son esenciales para la virulencia de *S. Typhimurium* (Browne et al., 2008). Por ejemplo, los efectores SpvB y SpvD son muy relevantes para la inhibición de mecanismos defensivos de la célula hospedadora: autofagia y respuesta inflamatoria, respectivamente (Chu et al., 2016; Li et al., 2016; Rolhion et al., 2016). También se codifican en el plásmido de virulencia las fimbrias Pef, que median en la adhesión de *Salmonella* a células epiteliales del intestino e inducen una respuesta pro-inflamatoria (Bäumler et al., 1996; Chessa et al., 2008). Por último, se ha descrito un ARN pequeño, denominado lesR-1, que se expresa cuando *Salmonella* está en el interior de los fibroblastos y es necesario para la virulencia en ratones (Gonzalo-Asensio et al., 2013).

#### e. Adhesinas

El acoplamiento de la bacteria a la célula diana consta de muchos pasos, en los que median varias adhesinas (Wagner and Hensel, 2011). El conjunto de adhesinas de *Salmonella* asciende a más de 20 (Hansmeier et al., 2017), y son codificadas por genes de las fimbrias como *fim* (Lockman and Curtiss, 1992), *pef* (Bäumler et al., 1996), *lpf* (Baumler and Heffron, 1995) y *agf* (Grund and Weber, 1988). También algunas adhesinas se codifican por genes no fimbriales como los autotransportadores *misL* (Dorsey et al., 2005) y *shdA* (Kingsley et al., 2002), u otros como *bapA* (Latasa et al., 2005) o el gen mencionado anteriormente en el SPI-4, *siiE* (Gerlach and Hensel, 2007). Cada adhesina media en la adhesión de *Salmonella* a un tipo celular en particular, debido a la especificidad por los receptores presentes en la superficie de las células diana. El mismo tipo celular puede ser atacado por diferentes adhesinas a medida que progresa la adhesión del patógeno (Misselwitz et al., 2011). También es muy relevante el flagelo en este apartado, ya que se requiere para alcanzar e invadir la célula diana, así como para ayudar en la adhesión junto con las fimbrias (Dibb-Fuller et al., 1999; Ibarra et al., 2010; Schmitt et al., 2001).

## 5. SISTEMAS DE SECRECIÓN

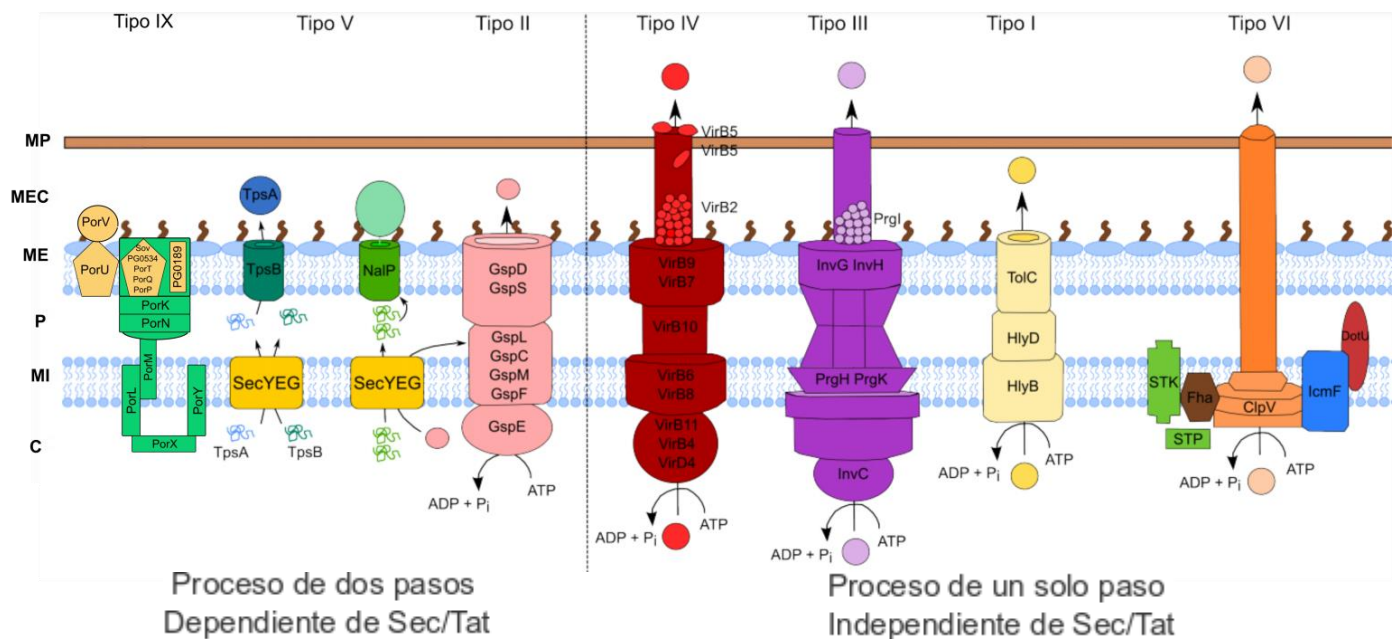
Las bacterias Gram negativas pueden componer unas estructuras denominadas sistemas de secreción, los cuales tienen un papel esencial en la patogénesis bacteriana. Estos sistemas de secreción son los encargados de translocar sustratos a través de sus membranas celulares hasta el exterior, e incluso en algunos casos directamente al citoplasma de la célula diana (Green and Meccas, 2016). La secreción de proteínas puede suponer todo un desafío para las bacterias Gram negativas, ya que se deben superar dos membranas (y en algunos casos, tres) para llevarlas a su objetivo. Los sistemas de secreción también son necesarios para ensamblar



estructuras en la superficie de la bacteria del tipo de los pili y las fimbrias. Aproximadamente el 3% del proteoma total de *Salmonella* constituye proteínas de secreción, que en conjunto reciben el nombre de secretoma (Arnold et al., 2009).

En las bacterias Gram negativas se encuentran al menos diez sistemas de secreción diferentes: del T1SS al T6SS, T8SS, T9SS, T10SS y el sistema *chaperone-usher* o CU (Costa et al., 2015; Filloux et al., 2008; Fronzes et al., 2009; Gerlach and Hensel, 2007; Rêgo et al., 2010; Saier, 2006). Se pueden distinguir dos grupos diferenciados en función del mecanismo de transporte en los sistemas de secreción:

- De un solo paso o independiente de Sec. En este caso, las proteínas se exportan directamente desde el citoplasma al exterior celular.
- De dos pasos o dependiente de Sec (o Tat). Aquí, las proteínas se exportan primero a través de la membrana interna hasta el periplasma. Para este primer paso de transporte, estos sistemas usan la ruta general secretora, llamada Sec, o la vía Tat. Posteriormente, las bacterias utilizan un sistema de secreción específico para el transporte de sustratos del periplasma, que de este modo atraviesan la membrana externa (Figura I.5).



**Figura I.5. Esquema de los principales sistemas de secreción en bacterias Gram negativas.** Se muestran los sistemas de secreción en dos pasos (T2SS, T5SS y T9SS) y los sistemas de secreción de un solo paso (T1SS, T3SS, T4SS y T6SS). C=citosol, MI=membrana interna, P=periplasma, ME=membrana externa, MEC=matriz extracelular, MP=membrana plasmática. Adaptado de (Filloux et al., 2008; Fronzes et al., 2009; Lasica et al., 2017).

A continuación, se hace una descripción de cada uno de los sistemas de secreción bacterianos.

#### a. Sistemas de secreción tipo I (T1SS)

Los T1SS son sistemas heterotriméricos que facilitan el paso de proteínas de diferente tamaño a través de la envuelta celular. Están compuestos por un transportador de membrana interna ABC (*ATP-binding cassette*) que proporciona la energía para la secreción de la proteína que corresponda; una proteína de membrana externa que forma el poro; y una proteína adaptadora que hace de puente entre la membrana interna (MI) y la membrana externa (ME) (Thomas et al., 2014). Los T1SS secretan sustratos en un solo paso, sin necesidad de un intermediario periplásmico estable (Koronakis et al., 1991). Los T1SS están involucrados en la secreción de una gran variedad de proteínas: citotoxinas que forman parte de la familia de las proteínas RTX (*repeats-in-toxin*), proteínas de la superficie celular, proteasas, lipasas, bacteriocinas y proteínas de hemoadquisición (Omori and Idei, 2003).

Por ejemplo, la SPI-4 de *Salmonella* codifica un T1SS, a través del cual se secreta la proteína SiiE, una adhesina de 600 kDa que favorece un contacto estrecho de la bacteria con las protuberancias de la membrana apical de las células intestinales. Además, en colaboración con el T3SS-1, ayudando a las bacterias a atravesar la barrera epitelial (Gerlach et al., 2007; Gerlach et al., 2008; Wille et al., 2014). Esta proteína tiene sitios de unión para iones de calcio que son esenciales para promover su secreción (Peters et al., 2017). Otra adhesina de *Salmonella*, es BapA, una proteína que se secreta a través del T1SS. BapA participa en la formación de biopelículas y en la invasión de *S. Enteritidis* (Latasa et al., 2005).

#### b. Sistemas de secreción tipo II (T2SS)

Los T2SS constituyen maquinarias multicomponentes que utilizan un mecanismo de dos pasos para la secreción. Durante el primer paso, el precursor de la proteína efectora se transloca al periplasma a través de la membrana interna mediante el translocón Sec o la vía Tat (Gold et al., 2007; Voulhoux et al., 2001). Una vez se encuentra en el periplasma, el efector se secreta por el T2SS a través de la membrana externa. El translocón T2SS está compuesto por 12 proteínas esenciales para su biogénesis y la secreción, las cuales se encuentran distribuidas entre ambas membranas bacterianas, en el citoplasma y en el periplasma (Gu et al., 2017). Este sistema se encuentra en patógenos como *Erwinia*, *Legionella*, *Vibrio* o *Yersinia* (Korotkov et al., 2012); pero no se ha encontrado en otros como *Salmonella* o *Shigella*.

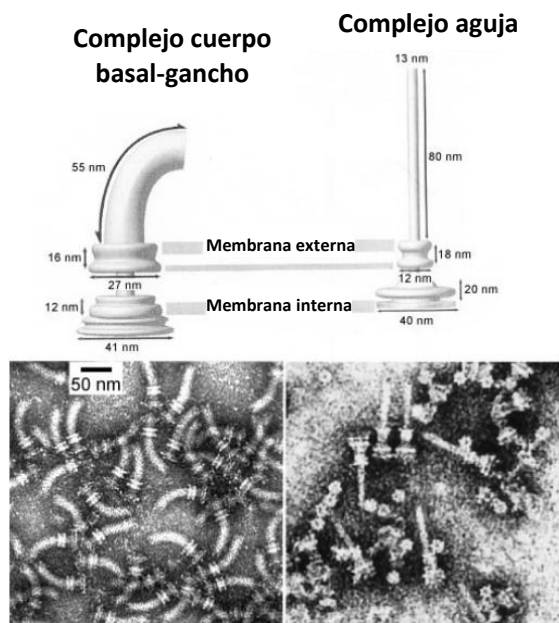
#### c. Sistemas de secreción tipo III (T3SS)

Los T3SS también se conocen como inyectisomas o agujas moleculares. Los T3SS operan bajo un mecanismo de secreción de un solo paso, y son utilizados por muchos patógenos o simbiontes Gram negativos de plantas y animales, incluidos miembros de los géneros *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Rhizobium*, *Escherichia* y *Pseudomonas*. Estos sistemas están genética, estructural y funcionalmente relacionados con los flagelos bacterianos (Cornelis and Van Gijsegem, 2000; Diepold and Armitage, 2015; Galán et al., 2014; Macnab, 2003; Tampakaki et al., 2004). Los T3SS transportan los efectores desde el citoplasma de la bacteria patógena hasta el citoplasma de la célula eucariótica hospedador. Por tanto,

este sistema de secreción atraviesa las dos membranas bacterianas, interna y externa, y también la membrana plasmática de la célula hospedadora (Cornelis, 2006; Galán and Wolf-Watz, 2006). A pesar de que los T3SS de diferentes patógenos inyectan en el hospedador distintos efectores, mantienen entre ellos ciertas semejanzas estructurales y funcionales, de modo que un T3SS de un género bacteriano puede secretar y translocar efectores de otro género bacteriano distinto (Ho and Starnbach, 2005).

Tal y como se puede apreciar en la **Figura I.6**, los T3SS están compuestos por más de 20 proteínas, repartidas entre un complejo ATPasa citosólico, un cuerpo basal (en el que se incluyen un anillo en la membrana interna, un cuello que atraviesa la zona periplásmica y un anillo externo que se expande por la membrana externa de la bacteria); y una aguja, que se extiende desde la membrana externa y se localiza en el espacio extracelular, a través de la cual se secretan los efectores (Deng et al., 2017). Para ser funcional, un T3SS requiere elementos adicionales tales como un complejo regulador citosólico ligado al cuerpo basal, una varilla interna que constituye la base de la aguja, y un translocón, que es un complejo proteico que forma un poro en la membrana del hospedador, la cual está asociada a la punta de la aguja (Cornelis, 2006). La secreción es promovida por la ATPasa citosólica (Akeda and Galán, 2005), aunque también se ha propuesto el gradiente protón-motriz como fuente primaria que provee la energía para la secreción (Lee and Rietsch, 2015).

El proceso de translocación típico ocurre desde la bacteria hasta el citosol del hospedador. Sin embargo, también hay pruebas que indican que los efectores localizados en la superficie bacteriana también pueden translocarse. Por ejemplo, se ha demostrado este tipo de transporte para el efector YopH de *Y. pseudotuberculosis*, y también puede ocurrir en *trans* a través del T3SS-1 de *Salmonella* (Akopyan et al., 2011).



**Figura I.6. Comparación del complejo gancho-cuerpo basal del flagelo (izquierda) y el complejo aguja utilizado en la secreción de factores de virulencia (derecha).** Los T3SS son estructuras relacionadas con el flagelo, compartiendo con él incluso ciertos mecanismos de regulación (Lin 2008, pallen 2005, Wang 2007). Imagen adaptada de (Macnab, 2003).

#### d. Sistemas de secreción tipo IV (T4SS)

Los T4SS están más extendidos que los anteriores, ya que se pueden encontrar tanto en bacterias Gram negativas como Gram positivas (Grohmann 2018). Ofrecen diferentes posibilidades a los patógenos, ya que a través de ellos se pueden secretar diferentes tipos de sustratos, desde simples proteínas a complejos multiproteicos o complejos proteína-ADN (Alvarez-Martinez and Christie, 2009; Llosa et al., 2009). Los T4SS se pueden clasificar en tres familias (Fronzes et al., 2009), según su función:

- i. Sistemas conjugativos que transfieren plásmidos y transposones desde una bacteria donadora a una bacteria receptora.
- ii. Sistemas de captación o liberación de ADN.
- iii. Sistemas de translocación de efectores que transportan ADN o proteínas al interior de células eucarióticas y están implicados en la virulencia de muchos patógenos Gram negativos.

Sin embargo, también se ha propuesto una nueva clasificación más simple para dividir todos los T4SS en dos clases, y así evitar el solapamiento funcional con la clasificación convencional: encontraríamos el grupo IVa, cuyo referente sería el sistema VirB/D4 de *Agrobacterium tumefaciens*; y el grupo IVb, ejemplificado por el sistema Dot/Icm de *Legionella pneumophila* (Chandran Darbari and Waksman, 2015; Kubori and Nagai, 2016).

#### e. Sistemas de secreción tipo V (T5SS)

Los T5SS translocan sustratos en dos pasos. Se pueden subdividir en 5 subcategorías, denominadas de Va a Ve, según el procedimiento que siguen para ejecutar dicha translocación. Todos ellos, a excepción del tipo Vb, son autotransportadores. En una primera etapa, se secretan como precursores a través de la membrana interna en un proceso dependiente de Sec. Posteriormente, gracias a su dominio barril- $\beta$ , forman un canal en la membrana externa, a través del cual se secreta el dominio pasajero, que desarrollará su actividad correspondiente en el espacio extracelular (Gawarzewski et al., 2013; Leyton et al., 2012). El tipo Vb funciona de una forma similar, aunque el dominio pasajero y el transportador son dos polipéptidos diferentes (Fan et al., 2016).

Aproximadamente 700 proteínas, con funciones tan diversas como autoagregación, adherencia, invasión, citotoxicidad, resistencia a suero, diseminación célula a célula y proteólisis, usan estos sistemas de secreción para atravesar ambas membranas de la bacteria, interna y externa (Henderson and Nataro, 2001; Mazar and Cotter, 2007). Algunos de los autotransportadores que más se han estudiado de *Salmonella* son las proteínas ShdA (Kingsley et al., 2000) y MisL (Blanc-Potard et al., 1999) y SadA (Raghunathan et al., 2011). ShdA se expresa cuando la bacteria se encuentra en el intestino del hospedador y cuenta con un dominio que facilita la adhesión a fibronectina de la célula hospedadora. ShdA es muy importante para que *Salmonella* persista en el hospedador, y se ha detectado su presencia a largo plazo en heces de ratón (Kingsley et al., 2002). MisL, codificada en la SPI-3, es una adhesina capaz de unirse a la fibronectina y está implicada en la colonización del intestino

(Dorsey et al., 2005). SadA es un autotransportador trimérico del tipo Vc, y es otra adhesina cuya expresión contribuye a procesos como la agregación celular, formación de biofilm y la adhesión a células intestinales humanas CaCo-2 (Raghunathan et al., 2011).

#### **f. Sistemas de secreción tipo VI (T6SS)**

En estos sistemas, la secreción se realiza en un solo paso (Pukatzki et al., 2006). Están ampliamente distribuidos entre las proteobacterias, entre las que se incluyen patógenos como *P. aeruginosa*, *E. coli* enteroagregativa, *S. Typhimurium*, *Vibrio cholerae* y *Yersinia pestis* (Boyer et al., 2009). Estos sistemas se componen de 13 subunidades esenciales, junto con otros componentes accesorios (Cascales, 2008; Nguyen et al., 2018; Pukatzki et al., 2009). Pueden translocar proteínas tanto a células eucarióticas como procarióticas, por lo que tienen un papel tanto en virulencia como en interacciones con otras bacterias (Ho et al., 2014). En *Salmonella*, el primer T6SS se descubrió con la caracterización de la SPI-6 (Folkesson et al., 2002), que anteriormente se conocía como SCI (*Salmonella enterica centisome 7 genomic island*).

En cuanto a la contribución del T6SS a la virulencia del patógeno, existen resultados contrapuestos. Mientras que algunos trabajos sugieren que este sistema limita el crecimiento intracelular en macrófagos, disminuyendo la tasa de mortalidad en ratones (Parsons and Heffron, 2005); otros estudios muestran que el T6SS es necesario para la completa proliferación en los macrófagos y la virulencia en ratones (Liu et al., 2013). Además, el T6SS contribuye a la colonización gastrointestinal y a la diseminación sistémica en pollos (Pezoa et al., 2013). También se ha demostrado que su actividad antibacteriana es fundamental en *Salmonella* para establecer la infección en el intestino del hospedador (Sana et al., 2016). Mediante el análisis informático de los genomas, se han identificado otros tres T6SS en *S. enterica* (Blondel et al., 2009), encontrados en las SPI-19, SPI-20 y SPI-21. La mayoría de los serovares posee tan sólo un T6SS, codificado en SPI-6 o en SPI-19, aunque algunos pueden albergar dos.

#### **g. Sistemas de secreción de tipo VIII (T8SS)**

Este sistema está implicado en el ensamblaje y la secreción del curli. El curli son fibras amiloides extracelulares que se producen por muchas bacterias entéricas, entre las que se incluye *Salmonella*. Forman parte de los biofilms y son importantes para la colonización de la superficie, así como la interacción con factores del hospedador y del sistema inmune (Desvaux et al., 2009; Evans and Chapman, 2014).

#### **h. Sistemas de secreción de tipo IX (T9SS)**

Los T9SS tienen la función de generar un revestimiento para la bacteria que la proteja en procesos de virulencia, deslizamiento y degradación de biopolímeros complejos. Los T9SS cuentan con muchos sustratos, entre los que se encuentran proteinasas, glicosilasas,

nucleasas, lipasas, adhesinas, hemagglutininas y proteínas ricas en leucina o LRP (*leucine-rich proteins*). Este sistema de secreción está presente en más de mil especies secuenciadas del superfilo Fibrobacteres-Chlorobi-Bacteroidetes (Veith et al., 2017).

#### i. Sistemas de secreción de tipo X (T10SS)

Los T10SS son sistemas de secreción en dos pasos, que dependen de la actividad de la proteína de membrana holina y enzimas que modifican la pared celular para la secreción de sustratos desde el periplasma hasta el exterior a través de la membrana externa de la bacteria. Esta enzima varía según la especie de bacteria: por ejemplo, en el caso de *Serratia marcescens* se facilita la secreción con una endopeptidasa; mientras que la secreción de la toxina tifoide en *S. enterica* se apoya en la actividad de una muramidasa. Mediante análisis genómicos, se ha determinado que este tipo de secreción está conservado en un amplio espectro de bacterias, y está implicado en la secreción de enzimas hidrolíticas y toxinas (Palmer et al., 2021).

#### j. Sistemas de secreción CU

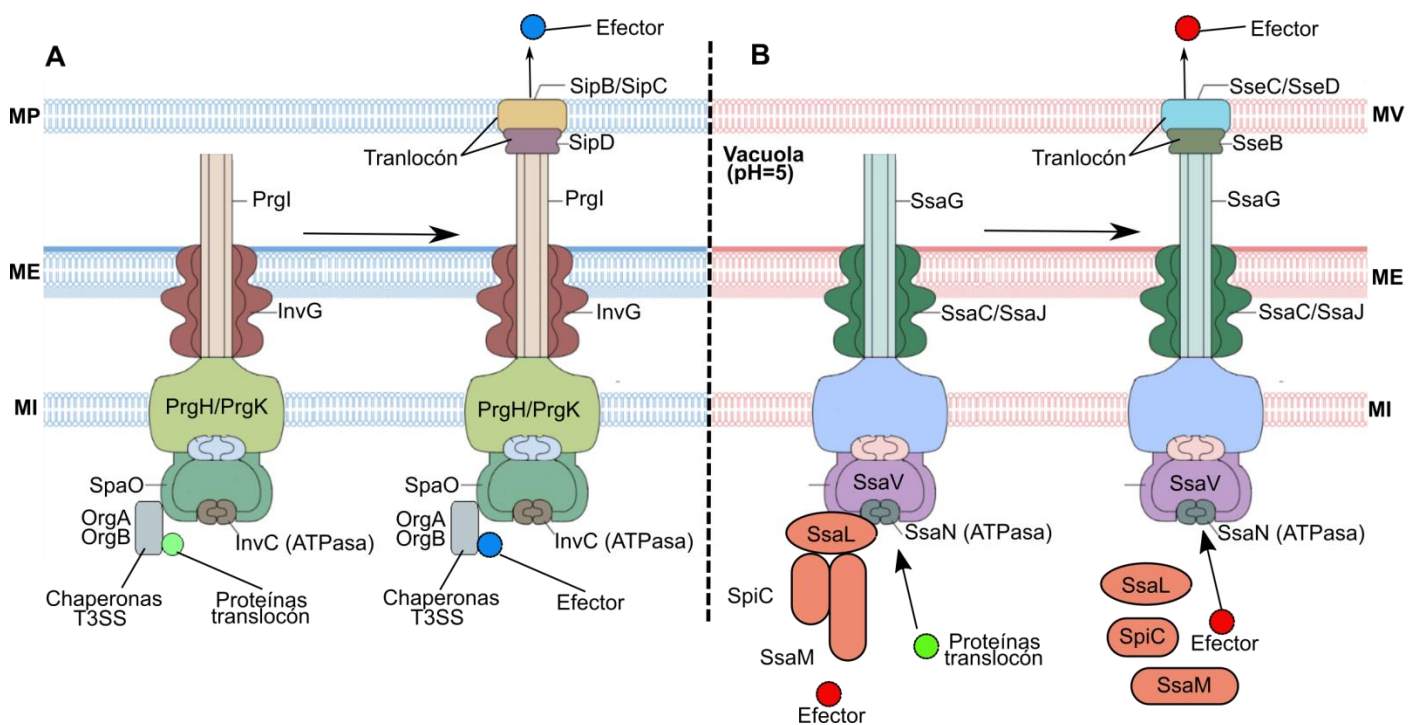
El nombre de estos sistemas de secreción tiene su origen por el inglés *chaperone-usher*. Los sistemas CU son sistemas simples que realizan la translocación en dos pasos, y para ello sólo se necesitan dos proteínas: una proteína acomodadora de membrana externa, que forma el canal con el dominio barril- $\beta$ ; y una chaperona periplásmica, que facilita el plegamiento de la proteína para su secreción por dicho canal (Waksman and Hultgren, 2009). Los sistemas CU son responsables del ensamblaje de *pili* o fimbrias en la superficie de bacterias Gram negativas. Dichas estructuras, formadas por múltiples subunidades, son factores de virulencia empleados por las bacterias para el reconocimiento, adhesión e invasión del hospedador y para la formación de *biofilms* (Hospenthal et al., 2017). En su momento, se propuso la denominación de estos sistemas como T7SS (Desvaux et al., 2009), aunque este nombre ya lo usa otro sistema, específico de bacterias Gram positivas (Abdallah et al., 2007).

## 6. T3SS DE SALMONELLA

Las dos especies del género *Salmonella* cuentan con el T3SS codificado en la SPI-1 (T3SS-1). Además, la especie *S. enterica* sintetiza un T3SS adicional (T3SS-2) codificado en la SPI-2, por lo que se cree que evolutivamente fue adquirido de forma más reciente (Bäumler, 1997). Ambos sistemas de secreción desempeñan un papel importante en la interacción con el hospedador durante la patogénesis. El T3SS-1 facilita la invasión de células no fagocíticas y contribuye al traspaso de la barrera epitelial por parte de *Salmonella*; mientras que el T3SS-2 es necesario para la replicación bacteriana dentro de los variados tipos celulares eucarióticos (Aussel et al., 2011; Geddes et al., 2007) que componen todos los órganos alcanzados durante la infección sistémica (Carter and Collins, 1974).

### a. T3SS-1

La SPI-1 se ha investigado durante décadas, demostrándose que codifica un T3SS, una jeringa molecular que inserta directamente un conjunto de efectores relacionados con la virulencia (codificados tanto en la misma SPI-1 como en otros lugares del genoma de *Salmonella*) en las células hospedadoras (Deng et al., 2017). En cada célula bacteriana podemos encontrar entre 10 y 100 complejos de este tipo (Kubori et al., 1998) localizados a lo largo del eje bacteriano, con una distribución similar a la de los flagelos. Esto permite a las bacterias extracelulares aumentar la probabilidad de establecer contacto con las células hospedadoras para la inyección de proteínas efectoras. Las subestructuras del T3SS-1 son complejos proteicos homo o heteromultiméricos (**Figuras I.7 e I.9**). Encontramos en primer lugar el anillo interno, que consta de 24 subunidades de PrgK y PrgH; posteriormente, el anillo externo y el cuello, que se componen de 15 copias de InvG (Schraidt and Marlovits, 2011; Schraidt et al., 2010; Worrall et al., 2016). La aguja está compuesta por aproximadamente 120 copias de la proteína PrgI, con una disposición helicoidal similar a la del filamento flagelar. El lumen central de la aguja, por el cual se secretan los efectores, tiene un diámetro de unos 25 Å (Loquet et al., 2012). La aguja está conectada a la varilla interna, la cual está formada por PrgJ. Esta subestructura atraviesa el cuerpo basal y controla la longitud de la aguja (Marlovits et al., 2006). La punta de la aguja se forma con 5 moléculas de SipD que interaccionan con PrgI mediante cambios conformacionales de ambas proteínas (Lunelli et al., 2011; Rathinavelan et al., 2014). Finalmente, cuando se produce el contacto del T3SS-1 con la membrana plasmática de la célula hospedadora se desencadena una liberación de las proteínas translocadoras SipB y SipC, que forman el poro o translocón en la membrana, por el cual los efectores entran en el hospedador (Myeni et al., 2013).



**Figura I.7. Esquema representativo de la estructura y composición de los T3SS de *Salmonella*. (A) Control de la secreción mediada por el T3SS-1. Se muestra el control de la secreción del translocón y los efectores dependientes de la SPI-1. El complejo SpaO-OrgAB opera como una plataforma sobre la que se acopla el translocón, mientras que los efectores son dirigidos al complejo mediante chaperonas del**

T3SS. Los efectores se secretan inmediatamente después de la secreción de las proteínas del translocón. **(B) Control de la secreción mediada por el T3SS-2.** El complejo formado por SpiC, SsaL y SsaM controla la secreción del translocón y los efectores de la SPI-2 en respuesta a diferencias en el pH externo: con un pH de 5 (dentro de la SCV), el complejo bloquea la secreción de los efectores, promoviendo que se secreten previamente las proteínas del translocón. El cambio a pH 7, más neutro, se detecta por los componentes extracelulares del T3SS-2, y hace que se disocie el complejo SpiC-SsaL-SsaM, induciendo ahora la secreción de efectores. *Nota: la arquitectura del T3SS-2 no se conoce en detalle y se propone de acuerdo con la similitud de la secuencia de aminoácidos entre los componentes previstos del T3SS-2 y lo que se sabe de otros T3SS.* ME=membrana externa; MI=membrana interna; MP=membrana plasmática; MV=membrana vacuolar. Imagen adaptada de (Buttner, 2012).

#### b. T3SS-2

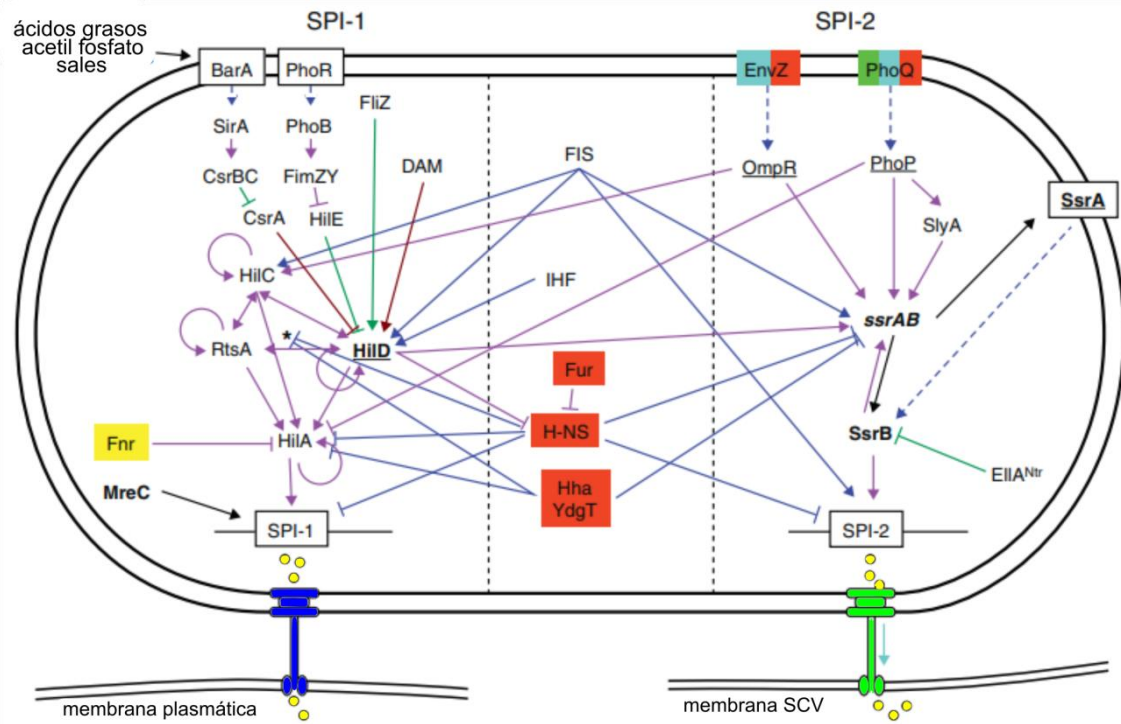
A diferencia de lo que sucede con los T3SS-1, en cada célula bacteriana solamente se codifican una o dos copias de este sistema, localizadas en los polos (Chakravorty et al., 2005). Este sistema se activa cuando *Salmonella* ya ha formado la SCV y las membranas de la bacteria están ya en contacto con la membrana de la célula diana, de modo que parece ser suficiente un único injectisoma para la translocación de los efectores en esta etapa de la infección. La estructura multiproteica del T3SS-2 (**Figuras I.7 e I.9**) atraviesa la envuelta bacteriana y termina en un translocón, insertado en la membrana vacuolar de la célula hospedadora. Este translocón está formado por las proteínas SseB, SseC y SseD (Nikolaus et al., 2001; Ruiz-Albert et al., 2003). Los mutantes *ssaG*, *ssaH* y *ssal* son incapaces de translocar efectores al hospedador ni de formar estructuras superficiales, lo que sugiere una función para SsaG, SsaH y Ssal en la formación de un T3SS-2 funcional y de estructuras de superficie de membrana (Chakravorty et al., 2005). La secreción selectiva de este sistema está controlada por un complejo regulador formado por tres proteínas (SsaL, SsaM y SipC). Este complejo se localiza en el citosol bacteriano, probablemente en contacto con el cuerpo basal (Yu et al., 2004; Yu et al., 2010). SsaQ constituye la plataforma citoplasmática (anillo C) conectada a la base del sistema de secreción (Diepold et al., 2010; Yu et al., 2011).

## 7. REGULACIÓN DE LOS T3SS DE SALMONELLA

La adaptación de *Salmonella* a las diferentes condiciones ambientales con las que puede encontrarse a lo largo del proceso de infección requiere una regulación rápida y eficaz de la actividad de los T3SS. Una amplia gama de factores externos e internos influye en la regulación de estos sistemas. Una regulación además, que se produce a diferentes niveles, desde la transcripción de genes hasta las modificaciones postraduccionales de proteínas o la secreción; de este modo, se controla el proceso con mayor precisión en todo momento (Golubeva et al., 2012; Moest and Méresse, 2013). Los genes de la SPI-1 se expresan principalmente en el intestino durante las etapas iniciales de la infección. Posteriormente, una vez *Salmonella* se introduce en las células epiteliales, se produce un aumento en la expresión de la SPI-2 y, finalmente, la SPI-2 muestra una expresión predominante una vez que la bacteria ha atravesado el epitelio y reside en las vacuolas de los macrófagos (Hautefort et al., 2008). A pesar de las diferencias temporales en su expresión, SPI-1 y SPI-2 están controladas por proteínas reguladoras comunes. Así, los genes de ambas islas son fuertemente reprimidos por



la proteína H-NS (Lucchini et al., 2006; Oshima et al., 2006) y activados por IHF, FIS y OmpR (Ellermeier and Slauch, 2007; Feng et al., 2003; Kelly et al., 2004; Mangan et al., 2006; Osborne and Coombes, 2011). A su vez, existe una relación entre las SPI-1 y SPI-2 por la inducción de la expresión de *hilA* (SPI-1) y de *ssrAB* (SPI-2) por HiiD, que disminuye la acción represora de H-NS (Bustamante et al., 2008). En la **Figura I.8** se esquematizan las vías de regulación de los dos sistemas de secreción de *Salmonella*.



**Figura I.8. Regulación de los T3SS de *Salmonella*.** A la izquierda se muestra la regulación de la SPI-1 y a la derecha, la de la SPI-2. Los reguladores clave se reflejan en negrita. Hay elementos que participan en la regulación de ambas islas y se representan en el centro, además de aparecer subrayados los responsables de la regulación cruzada. La naturaleza del impacto se indica con un código de colores. Por una parte, los factores ambientales se muestran en rojo (osmolaridad), caja celeste (pH), caja amarilla (oxígeno) y caja verde (péptidos antimicrobianos). Por otra parte, la síntesis proteica se muestra en morado (unión a promotor/transcripción), azul oscuro (estructuración del ADN/transcripción), rojo (regulación postranscripcional del ARN) y caja rosa (regulación traduccional). Finalmente, las interacciones proteicas se presentan en verde oscuro (unión directa) y azul oscuro intermitente (fosforilación). Imagen adaptada de (Moest and Méresse, 2013).

### a. Regulación del T3SS-1

La activación del T3SS-1 de *Salmonella* se produce en el lumen intestinal, debido a diversos factores ambientales como la osmolaridad, la tensión de oxígeno, el pH (Altier, 2005), ácidos grasos de cadena corta tales como acetato, formiato, propionato y butirato (Golubeva et al., 2012); y ácidos grasos de cadena larga (Golubeva et al., 2016). Así, es probable que, tras la colonización, la bacteria comience con la secreción de efectores al entorno intestinal. Esta idea está apoyada por algunos estudios, en los cuales se muestra que, aproximadamente, el 80-90% de efectores secretados por el T3SS-1 de *Salmonella* se asocian a bacterias no adheridas o

están en el medio de infección, mientras que sólo el 10% se translocan al interior de la célula hospedadora (Collazo and Galán, 1997).

La expresión de la SPI-1 está controlada por cuatro activadores transcripcionales tipo AraC codificados en esta isla: HilA, HilC, HilD e InvF. A través de complejos mecanismos, HilC e HilD controlan su propia transcripción y la de su compañero, y juntos activan a *hilA*. RtsA, al igual que HilC e HilD también es otro activador de la expresión de la SPI-1, mediante su unión aguas arriba del gen regulador principal *hilA*. HilA activa los genes estructurales del T3SS-1 (Ellermeier et al., 2005; Olekhnovich and Kadner, 2002; Schechter and Lee, 2001). Ni HilC ni RtsA son capaces de activar por sí mismos a *hilA*, aunque sí actúan amplificando la transcripción mediada por HilD (Cott Chubiz et al., 2010; Golubeva et al., 2012). HilA, a su vez, activa *invF* y los genes que codifican el T3SS-1 y sus efectores (Bajaj et al., 1995).

Estos reguladores forman una red que incorpora las señales procedentes de reguladores globales. Por ejemplo, Lrp reprime la transcripción de los principales reguladores de la virulencia (*hilA* e *invF*) uniéndose a sus regiones promotoras, reduciendo de este modo la expresión de la SPI-1 (Baek et al., 2009). H-NS y Hha, que son proteínas asociadas al nucleoide (NAP, *nucleoid associated proteins*), reprimen la expresión de *hilA* mediante la unión directa a regiones localizadas aguas arriba y abajo del promotor de dicho gen (Hołówka and Zakrzewska-Czerwińska, 2020; Queiroz et al., 2011). HilC e HilD son sustratos para la proteasa Lon, dependiente de ATP (Takaya et al., 2005), la cual contribuye a la represión de la SPI-1 tras la invasión de células epiteliales (Boddicker and Jones, 2004). HilE es un regulador negativo de la SPI-1 (Fahlen et al., 2000) que puede interferir con la función de HilD mediante una interacción proteína-proteína directa (Baxter et al., 2003). La transcripción de *hilE* se activa por el regulador de las fimbrias FimYZ (Baxter and Jones, 2005) y se reprime por el regulador Mlc, dependiente del sistema fosfotransferasa PTS (*phosphotransferase system*) (Lim et al., 2007). Esta señalización se transmite a la SPI-1 a través de HilD. Además, los sistemas de dos componentes PhoQ/PhoP y PhoR/PhoB también pueden activar la expresión de *hilE* (Ellermeier and Slauch, 2007; Jones, 2005) y reprimir la expresión de *hilA* (Golubeva et al., 2012; Lucas et al., 2000).

La SPI-1 también está regulada por el sistema Csr, concretamente, la sobreexpresión de *csrA* reprime la expresión de esta isla (Altier et al., 2000; Martínez et al., 2011). El sistema regulador de dos componentes BarA/SirA activa la expresión de la SPI-1 a través de la vía Csr, activando la transcripción de los genes *csrB* y *csrC*, los cuales codifican antagonistas de CsrA (Fortune et al., 2006). Otro activador de la SPI-1 es la proteína Fur, el regulador de la absorción de hierro (Ellermeier and Slauch, 2008; Teixidó et al., 2011; Troxell et al., 2011). En *S. Enteritidis*, la expresión de *hilA* en condiciones aerobias está reprimida por Fnr (Immerseel et al., 2008), mientras que en *S. Typhimurium* activa muchos genes de la SPI-1 en condiciones anaerobias (Fink and Cookson, 2007). El sistema de dos componentes EnvZ/OmpR activa la SPI-1 mediante el control de la expresión de *hilD* a nivel postranscripcional (Ellermeier and Slauch, 2007; Ellermeier et al., 2005). Se ha descrito que FlhZ, un inhibidor de RpoS (Pesavento et al., 2008), activa la expresión de la SPI-1 mediante el control de la actividad de HilD (Cott Chubiz et al., 2010). También podemos encontrar una regulación de la SPI-1 por metilación de adenina en el ADN (Balbontín et al., 2006; García-Del Portillo et al., 1999; López-Garrido and Casadesús, 2010). Esta regulación, dependiente de la metilasa Dam, es transmitida a través de HilD a nivel

postranscripcional, y ejercida por productos de otro elemento genético adquirido horizontalmente, el operón fimbrial *std*, que codifica un tipo de apéndice ensamblado por el sistema CU (López-Garrido and Casadesús, 2012). El citoesqueleto bacteriano también es importante en la regulación de este sistema, aunque no para su ensamblaje y actividad (Bulmer et al., 2012). Por último, se ha descrito la represión de la SPI-1 por LeuO. Este regulador transcripcional de tipo LysR actúa mediante dos vías: una vía principal, a través de la activación de *hile*, cuyo producto Hile es un inhibidor de Hild; y una vía secundaria independiente de Hile e Hild (Bustamante and Calva, 2014; Dillon et al., 2012; Espinosa and Casadesús, 2014).

#### **b. Regulación del T3SS-2**

La expresión del T3SS-2 depende principalmente de tres sistemas reguladores de dos componentes: SsrA/SsrB, PhoQ/PhoP y EnvZ/OmpR.

El primero de estos tres sistemas, SsrA/SsrB, es el regulador principal de las funciones del T3SS-2 (Fass and Groisman, 2009). SsrA es el sensor integral de membrana, mientras que SsrB es el regulador de respuesta. El sistema se activa cuando *Salmonella* se encuentra dentro de macrófagos, pero también cuando las bacterias crecen en medio mínimo a pH ácido (Miao et al., 2002). SsrB es fosforilado, y entonces se une a todos los promotores de la SPI-2 (Walthers et al., 2007). Esto es esencial para la expresión del T3SS-2 y sus efectores, incluyendo también aquellos efectores que se codifican fuera de la SPI-2 (Worley et al., 2000). Además, SsrB activa su propia transcripción, junto con la de *ssrA* (Feng et al., 2003). Esto está negativamente controlado por EIIA<sup>Ntr</sup>, el cual se une directamente a SsrB, impidiendo su unión a los promotores diana y evitando así los posibles efectos adversos de la sobreexpresión de los genes de la SPI-2 (Choi et al., 2010). SsrB activa directamente la transcripción de los genes que codifican los sustratos del T3SS-2 (SifA, SifB, SseJ, PipB, etc.) y promueve la transcripción del propio T3SS-2 mediante el desplazamiento de H-NS de la región promotora de la SPI-2 (Walthers et al., 2011). Además, H-NS reprime la expresión de *ssrA* mediante la unión directa a su promotor (Bustamante et al., 2008). Por último, las proteínas NAP también son muy relevantes en todo el proceso de regulación por SsrA/SsrB de este sistema de secreción. Encontramos a YdgT y Hha, que son dos NAP que reprimen la transcripción de los genes de la SPI-2 de una forma dependiente de SsrB (Coombes et al., 2005; Silphaduang et al., 2007); mientras que también hay otras NAP, como IHF y FIS, que, al contrario, son necesarias para la correcta expresión de los genes de la SPI-2 (Kelly et al., 2004; Lim et al., 2006; Mangan et al., 2006; Yoon et al., 2003).

FIS puede regular la expresión de la SPI-2 a través del control de la expresión de otros genes como *phoP*. PhoP es un importante regulador de la SPI-2 (Bijlsma and Groisman, 2005; Delwick et al., 1999; Lee et al., 2000; Worley et al., 2000), aunque no es imprescindible (Miao et al., 2002). El sistema de dos componentes PhoQ/PhoP es un sistema regulador ancestral conservado en *Salmonella* y otras especies relacionadas. Es necesario para la virulencia y la supervivencia de *Salmonella* dentro de macrófagos (Groisman, 2001; Miller et al., 1989). PhoP se une directamente al promotor de *ssrB*, y controla SsrA a nivel postranscripcional (Bijlsma and Groisman, 2005). Además, PhoP regula la expresión y/o activación de la proteína SlyA

(Cano et al., 2001; Navarre et al., 2005). SlyA se une al promotor de *ssrA*, regulando la expresión de los genes de la SPI-2. El papel de SlyA como activador de la SPI-2 parece estar limitado a impedir el silenciamiento por H-NS (Christian Perez et al., 2008).

EnvZ/OmpR tiene un papel muy relevante en la expresión de la SPI-2. OmpR actúa como regulador de respuesta, uniéndose a los promotores de *ssrA* (Lee et al., 2000) y de *ssrB* (Feng et al., 2003) y promoviendo su transcripción. Aunque el sitio de unión de OmpR al promotor de *ssrA* solapa con el de SsrB, no parece que OmpR antagonice la represión que promueve H-NS (Bustamante et al., 2008).

El T3SS-2 también está regulado a nivel de secreción por un sensor de pH desconocido que reacciona al pH neutro del citoplasma eucariótico. El T3SS-2 se ensambla en condiciones de pH ácido en el ambiente vacuolar, para después secretar las proteínas del translocón y cantidades insignificantes de los efectores. La formación del translocón permite la detección del pH neutro del citoplasma eucariota, provocando la disociación y degradación del complejo regulador SsaL-SsaM-SpiC. De este modo, se permite la secreción de aproximadamente 25 efectores, los cuales se translocan a través de la membrana vacuolar (Yu et al., 2010).

Tal y como se puede observar en las descripciones, existe una cierta interferencia entre las señales transcripcionales que regulan la expresión de la SPI-1 y la SPI-2. Esto supone una ayuda para la transición que realiza *Salmonella* de la invasión del hospedador a la supervivencia intracelular. Uno de los elementos que causan estos cruces de señales es HlID. Este regulador del SPI-1 también favorece la expresión del sistema SsrA/SsrB, desplazando a H-NS de una región aguas abajo del promotor de *ssrAB* (Martínez et al., 2014). SsrB tiene una función regulatoria dual, ya que favorece la expresión de SPI-2 y reprime la expresión de SPI-1 durante las etapas intracelulares de la infección (Pérez-Morales et al., 2017). También se han descrito otros factores implicados en la regulación de ambas islas de patogenicidad, como pueden ser la alarmona bacteriana ppGpp, el factor sigma alternativo RpoS y la proteína DskA, accesoria de la ARN polimerasa (Rice et al., 2015).

## 8. EFECTORES DE LOS T3SS DE *SALMONELLA* Y PROCESOS EN LOS QUE INTERVIENEN

Los sustratos de los T3SS pueden codificarse tanto en las islas de patogenicidad (SPI-1 y SPI-2), como fuera de ellas, como es el caso de algunos fragmentos génicos con ciertos rasgos de haberse adquirido por transferencia horizontal. Cuando la bacteria entra en contacto con la superficie de la célula hospedadora activa la translocación de efectores a través del T3SS-1 (Galán, 2001; Hayward et al., 2005). Algunos de estos efectores están implicados en la inducción de pliegues locales de membrana (fenómeno denominado *membrane ruffling*) y en la invasión bacteriana (Galán, 1996). Otros efectores del T3SS-1 también desencadenan la activación de ciertas rutas de señalización: MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), producción de citoquinas proinflamatorias, reclutamiento de linfocitos PMN e inducción de inflamación intestinal aguda. El T3SS-2 se expresa dentro de la células hospedadora, activado por condiciones como el pH ácido y la limitación de nutrientes en el lumen de la SCV. El T3SS-2 transloca los efectores necesarios para la modulación del ambiente intracelular desde la

vacuola (Jennings et al., 2017; Malik-Kale et al., 2011). En la **Tabla 1.2** se enumeran los efectores identificados para ambos sistemas.

**Tabla 1.2. Efectores de los T3SS de *Salmonella*.** Adaptado de (Ramos-Morales, 2012) y ampliado de (Habyarimana et al., 2014; Jaslow et al., 2018; Jennings et al., 2017; Yang et al., 2015).

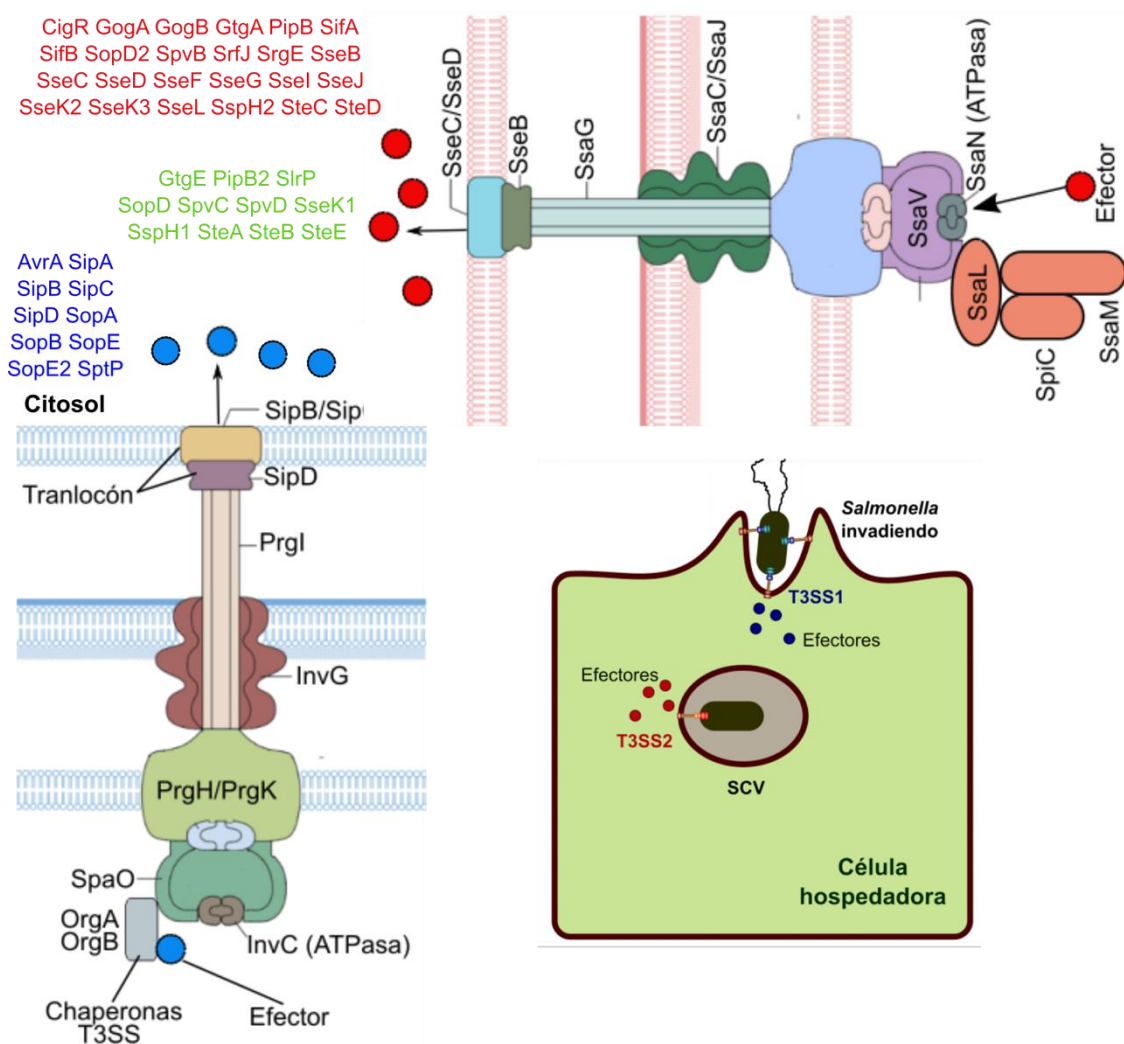
Efactor	Localización	T3SS	Actividad	Dianas celulares	Vía o proceso celular
<b>AvrA</b>	SPI-1	1	Acetiltransferasa Deubiquitilasa	$\beta$ -catenina, ERK2, $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , MKK4, MKK7, p53	Antiapoptótica, antiinflamatoria
<b>CigR</b>	SPI-3	2	-	-	-
<b>GogA</b>	Gifsy-1	2	Proteasa	-	-
<b>GogB</b>	Gifsy-1	2	-	FBXO22, SKP1	Inhibe la señalización NF- $\kappa$ B
<b>GtgA</b>	Gifsy-2	2	Metaloproteasa de zinc	p65, RelB	Inhibe la señalización NF- $\kappa$ B
<b>GtgE</b>	Gifsy-2	1 y 2	Proteasa de cisteínas	Rab29, Rab32, Rab38	Previene el reclutamiento de las proteínas Rab en la SCV y los SIT
<b>PipB</b>	SPI-5	2	-	Membrana celular	Formación de la SCV
<b>PipB2</b>		1 y 2		Cadena ligera de kinesina-1	Extensión de SIFs, reclutamiento de kinesina-1 a la SCV
<b>SifA</b>	-	2	-	Rab7, RhoA, SKIP, PLEKHM1, PLEKHM2, GDP- Rho	Formación de SIST, SIFs y SCV; detoxificación de lisosomas, estabilidad de la SCV y reclutamiento de moléculas
<b>SifB</b>		2	-	-	SCV
<b>Sip/SspA</b>	SPI-1	1	-	Caspasa-3, F- actina, T-plastina	Ensamblaje de actina, interrupción de uniones estrechas, migración de PMN, posicionamiento de SCV
<b>SipB</b>	SPI-1	1	-	Caspasa-1	Piroptosis
<b>SipC/SspC</b>	SPI-1	1	-	Citokeratina-8, citokeratina-18, Exo70, actina-F, syntaxina-6	Nucleación de actina, maduración de la SCV
<b>SipD/SspD</b>	SPI-1	1	-	-	Proteína del translocón
<b>SlrP</b>	-	1 y 2	Ligasa de ubiquitina E3	ERdj3, Trx1	Apoptosis, inhibe liberación de IL-1 $\beta$
<b>SopA</b>	-	1	Ligasa de ubiquitina E3	Caspasa-3, HsRMA1, Uch7	Invasión, escape de SCV, migración PMN

Efactor	Localización	T3SS	Actividad	Dianas celulares	Vía o proceso celular
<b>SopB/SigD</b>	SPI-5	1	Fosfatasa de fosfoinosítido / inhibidor de GEF	Cdc24, Cdc42	Invasión, respuesta nuclear, maduración de la SCV, secreción de fluidos
<b>SopD</b>	-	1 y 2	-	-	Invasión, inflamación, secreción de fluidos
<b>SopD2</b>	-	2	GAP	Rab7, Rab32	Inhibición de formación de LNT, formación de SIT, previene reclutamiento de Rab32
<b>SopE</b>	SopEΦ	1	GEF	Cdc42, Rab5, Rac1	Remodelación de actina, inflamación
<b>SopE2</b>	Fago remanente	1	GEF	Cdc42, Rac1	Remodelación de actina, inflamación
<b>SpiC/SsaB</b>	SPI-2	2	-	Hook3, TassC	Inhibición de la fusión de la SCV con los lisosomas
<b>SptP</b>	SPI-1	1	GAP, fosfatasa de tirosinas	Cdc42, Rac1, VCP, vimentina	Revierte la reorganización de actina, inhibición de la activación de ERK
<b>SpvB</b>	Plásmido	2	Ribosiltransferasa de ADP	G-actina	Despolimerización de actina, retraso de la citotoxicidad, inhibición de la autofagia, inhibición de polimerización de actina-F, apoptosis de macrófagos
<b>SpvC</b>	Plásmido	1 y 2	Liasa de fosfotreonina	ERK2, p-ERK, pJNK, p-p38	Inactivación de señalización MAPK
<b>SpvD</b>	Plásmido	1 y 2	Hidrolasa de cisteína	Xpo2	Inhibición de respuesta inflamatoria y señalización NF-κB
<b>SrfJ</b>	Isla de mioinositol	2	Hidrolasa de glucosilceramida	-	Respuesta inmune
<b>SrgE</b>	-	2	-	-	-
<b>SseB</b>	SPI-2	2	-	-	-
<b>SseC</b>	SPI-2	2	-	-	-
<b>SseD</b>	SPI-2	2	-	-	-
<b>SseF</b>	SPI-2	2	-	Plakoglobina, TIP60, SseG, ACBD3	Formación de SIFs, posicionamiento de la SCV

Efactor	Localización	T3SS	Actividad	Dianas celulares	Vía o proceso celular
<b>SseG</b>	SPI-2	2	-	Caprina-1, desmoplakina, SseF, ACBD3	Formación de SIFs, posicionamiento de la SCV
<b>Ssel/SrfH</b>	Gifsy-2	2	Hidrolasa de cisteína	Filamina A, IQGAP1, TRIP6	Modulación de la migración celular
<b>SseJ</b>	-	2	Aciltransferasa	RhoA	Modificación de la membrana de la SCV
<b>SseK1</b>	-	1 y 2	Transferasa de N-acetil glucosamina	FADD, TRADD, TBCB	Inhibe la señalización NF- $\kappa$ B estimulada por TNF $\alpha$ y la necroptosis
<b>SseK2</b>	-	2	Transferasa de N-acetil glucosamina	-	Inhibe la señalización NF- $\kappa$ B estimulada por TNF $\alpha$
<b>SseK3</b>	Fago ST64B	2	Transferasa de N-acetil glucosamina	TRIM32, TRADD	Inhibe la señalización NF- $\kappa$ B estimulada por TNF $\alpha$ y la necroptosis
<b>SseL</b>	-	2	Desubcunitilasa	I $\kappa$ B $\alpha$ , OSBP-1, talina, ubiquitina	Previene autofagia y acumulación de lípidos, induce muerte tardía de macrófagos
<b>SspH1</b>	Gifsy-3	1 y 2	Ligasa de ubiquitina E3	PKN1	Inhibe señalización por esteroides
<b>SspH2</b>	-	2	Ligasa de ubiquitina E3	14-3-3 $\gamma$ , AIP, BAG2, Bub3, Filamina A, Profilin-1, Sgt1, UbcH5-Ub, NOD1	Activa la señalización NOD1
<b>SteA</b>	Fago remanente	1 y 2	-	PI(4)P	Formación de SIT, rotura de membrana vacuolar
<b>SteB</b>	-	1 y 2	-	-	
<b>SteC</b>	-	2	Quinasa	MEK1, HSP27	Induce el ensamblaje de la malla de actina alrededor de la SCV
<b>SteD</b>	-	2	-	mMHCII, MARCH8	Inhibe la presentación de antígenos y activación de células T
<b>SteE/SarA</b>	Gifsy-1	1 y 2	-	-	Activa transcripción de STAT3 y la producción de IL-10

La idea que se ha expuesto con anterioridad, de que muchos efectores de *S. enterica* se secretan al entorno intestinal (Collazo and Galán, 1997) sugiere que los efectores de *Salmonella* podrían interactuar funcionalmente con el hospedador a nivel intra- y extracelular. Como ejemplo de la doble interacción funcional encontraríamos al efector SipA, que promueve gastroenteritis mediante dos motivos funcionales que desencadenan, de manera individual, mecanismos de entrada bacteriana o de inflamación (Wall et al., 2007). Una vez alcanza la superficie del epitelio intestinal, SipA es procesada por la caspasa-3 del hospedador. Una posibilidad sería que SipA necesita ser cortado antes de la interacción con la superficie apical de la célula hospedadora (Srikanth et al., 2010).

A pesar de las diferencias en los T3SS-1 y T3SS-2, algunos efectores de ambos sistemas se necesitan al mismo tiempo (Brawn et al., 2007; Lawley et al., 2006). En la **Figura I.9** se esquematizan sistemas de secreción de *Salmonella* con sus efectores asociados.

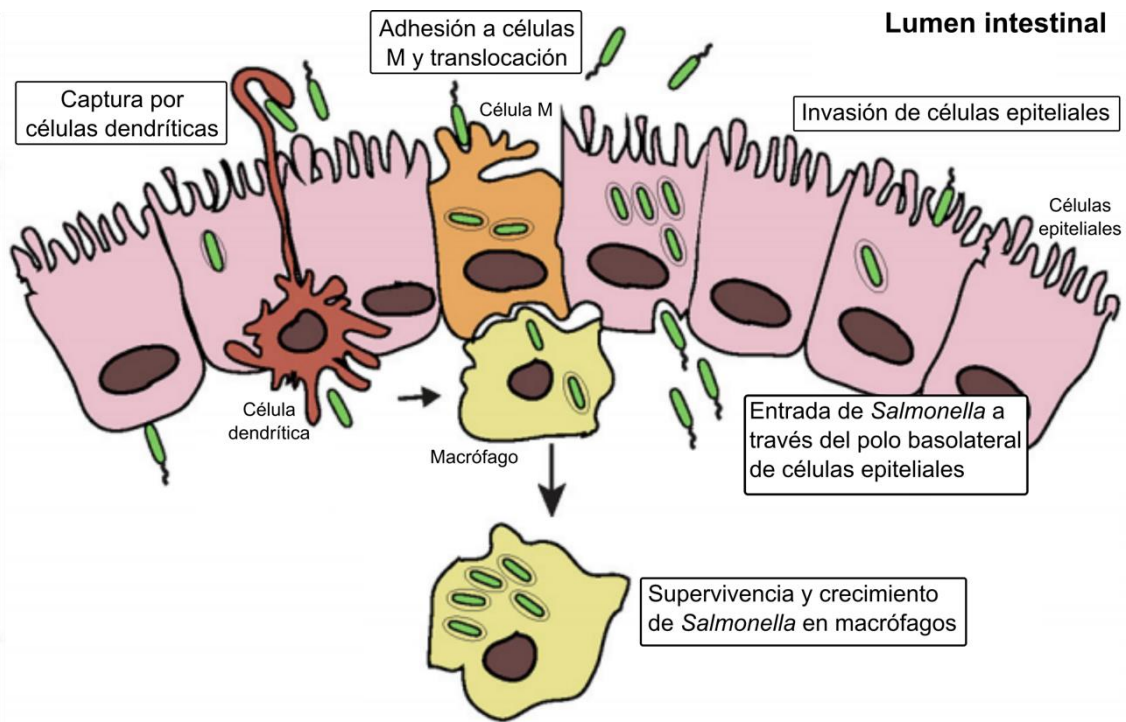


**Figura I.9. Representación esquemática de los T3SS de *Salmonella* y sus efectores.** Los efectores secretados por el T3SS-1 aparecen en azul, mientras que los secretados por el T3SS-2 se observan en color rojo. Los efectores representados en color verde se translocan a través de ambos sistemas. Imagen adaptada de (Ramos-Morales, 2012).



### a. Endocitosis mediada por *Salmonella*

Tras atravesar el estómago y competir con la microbiota, *Salmonella* infecta al hospedador tras invadir diferentes tipos de células intestinales: células M, células epiteliales y células dendríticas. Principalmente la vía de entrada de *Salmonella* son las células M, aunque también puede producirse a través de enterocitos (Figura I.10). Las células M son células epiteliales especializadas que transportan antígenos intestinales por pinocitosis a las células linfoides situadas bajo el epitelio intestinal, en las placas de Peyer (Brandtzaeg, 1989).



**Figura I.10. Estrategias de entrada de *Salmonella* en el hospedador.** Se muestran las diferentes formas por las que *Salmonella enterica* puede cruzar la barrera intestinal, sobrevivir en los diferentes tipos celulares y finalmente diseminarse sistémicamente. Las células M captan las bacterias mediante endocitosis facilitada por receptor; las células dendríticas las fagocitan; y las células epiteliales son permeables a la entrada de *Salmonella* gracias a la acción del T3SS-1. Una vez traspasada la barrera intestinal, *Salmonella* es captada por macrófagos y otros tipos de células defensivas (Garai et al., 2012). Imagen adaptada de (Hume et al., 2017).

La invasión de las células epiteliales se produce por endocitosis mediada por *Salmonella*. Esta endocitosis se caracteriza por una reestructuración acentuada del citoesqueleto de la célula hospedadora, generando numerosos pliegues y protrusiones en la membrana. Así, la bacteria acaba siendo embebida en una gran vesícula (Francis et al., 1993; Galán, 2001). Este proceso es similar a la macropinocitosis inducida por factores de crecimiento, y es morfológica y funcionalmente distinto de la endocitosis mediada por receptor, mecanismo mediante el cual otros patógenos entran en células no fagocíticas. Cuando *Salmonella* ya se encuentra dentro de la célula hospedadora, sobrevive y se replica en el interior de la SCV (Bakowski et al., 2008). Este mecanismo es el mejor descrito para la invasión por *Salmonella*, y requiere de la participación de numerosos efectores del T3SS-1: SipA, SipB, SipC, SopB, SopD, SopE y SopE2 (Figura I.11).

Aunque no es estrictamente necesaria para que el proceso se desarrolle de forma adecuada, SipA aumenta la eficacia de la invasión de *Salmonella* en el hospedador (Jepson et al., 2001). Esto se debe a que promueve la actividad nucleadora de actina de SipC e induce la actividad de la plastina T (fimbriina) en la célula hospedadora (Haraga and Miller, 2006; Zhou et al., 1999). SipA también se une a los filamentos de actina por su gran afinidad, estabilizándolos de dos formas: mecánicamente y previniendo su despolimerización por proteínas del hospedador como ADF/cofilina y gelsolina (McGhie et al., 2004).

SipB puede unirse directamente al colesterol de la membrana plasmática eucariótica, mediando el acoplamiento de *Salmonella* a las células diana. La eliminación del colesterol de la membrana plasmática limita la secreción tipo III por *S. Typhimurium*, disminuyendo el porcentaje de invasión de la célula hospedadora (Hayward et al., 2005). SipB, junto con SipC, es imprescindible para la formación del translocón en la membrana plasmática de la célula hospedadora (Myeni and Zhou, 2010).

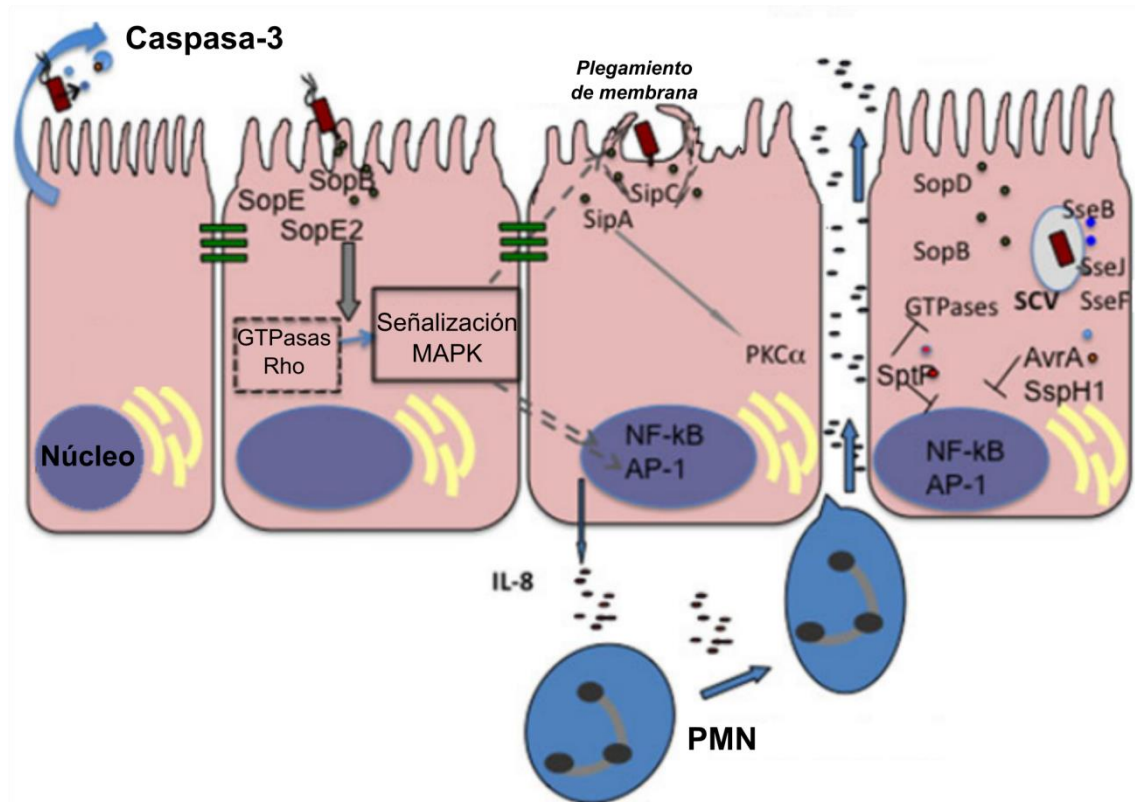
SipC, además, interacciona con Exo70, un componente del complejo exocisto, que media en la conexión y fusión de vesículas exocíticas con la membrana plasmática (Nichols and Casanova, 2010). La región C-terminal de este efector de *Salmonella* está implicada en la nucleación y manipulación de la actina (McGhie et al., 2001; Myeni and Zhou, 2010). También se ha descrito la participación de SipC en la acumulación en la zona apical de PERP, una proteína del hospedador clave para la respuesta inflamatoria inducida por *Salmonella* (Hallstrom and McCormick, 2016).

SopB (que también es denominado SigD) es una fosfatasa de lípidos, capaz de quitar residuos de las posiciones 4' y 5' de diferentes tipos de fosfatidilinositol. La actividad de este efector es necesaria porque media en la remodelación de actina, y contribuye a la formación de pliegues de membrana o *membrane ruffling* (Marcus et al., 2001; Piscatelli et al., 2016). SopB contribuye a la entrada de *Salmonella* al hospedador de diferentes modos. Activa indirectamente a RhoG (Patel and Galán, 2006) mediante la activación del factor de intercambio SGEF, a través de su interacción con la GTPasa Cdc42 (Alemán et al., 2005). También contribuye a la invasión mediante el reclutamiento del complejo AnxA2 (anexina A2)-p11-AHNAK en el sitio de invasión para mejorar la eficiencia de la invasión (Jolly et al., 2014). Por último, este efector media en el reclutamiento de SNX9 (*sorting nexin 9*) y SNX18 (Liebl et al., 2017; Piscatelli et al., 2016).

SopD es un efector que se puede translocar a través de los dos T3SSs de *S. enterica*. Actúa en cooperación con SopB e interviene en la fusión de membranas y formación del macropinosoma durante la infección (Bakowski et al., 2007). Promueve la secreción de fluidos y la respuesta inflamatoria en los intestinos infectados por *Salmonella* (Jones et al., 1998).

SopE y SopE2 son dos efectores que mimetizan el mecanismo de acción de los factores de intercambio de guaninas (GEFs) eucarióticos (Buchwald et al., 2002; Orchard and Alto, 2012; Schlumberger et al., 2003), que son los activadores endógenos de las GTPasas de la familia Rho. A través de este mecanismo, SopE y SopE2 activan las GTPasas Rac1 y Cdc42 (Hardt et al., 1998; Stender et al., 2000). SopE puede activar a las dos GTPasas mencionadas, mientras que SopE2 sólo activa a Cdc42 (Friebel et al., 2001). La activación de Rac1 por SopE es necesaria para provocar la internalización de *Salmonella* (Patel and Galán, 2006), a través del

reclutamiento del complejo regulador WRC (*WAVE regulatory complex*) y la cooperación de un factor de cambio de nucleótidos de guanina del hospedador denominado ARNO, también denominado citohesina-2 (Humphreys et al., 2012). Además, SopE también activa a RalA, una GTPasa requerida para el ensamblaje del exocisto (Nichols and Casanova, 2010).



**Figura I.11. Cambios inducidos por el T3SS-1 en las células hospedadoras.** *Salmonella* dirige su propia internalización en las células hospedadoras mediante un mecanismo caracterizado por la aparición de grandes pliegues de membrana en el sitio de entrada de la bacteria. Los efectores del T3SS-1 SipA, SipC, SopB, SopE y SopE2 inducen este proceso, el cual es revertido por la acción de SptP. A su vez, SipA, SopB, SopE y SopE2 contribuyen a la interrupción de las uniones estrechas, mientras que AvrA las estabiliza. Imagen adaptada de (Srikanth et al., 2011).

Al final del proceso de invasión también interviene SptP. Este efector desarrolla una función activadora de GTPasa o GAP (*GTPase activator protein*), que es antagonista a las funciones descritas para SopE y SopE2. SptP inactiva a Rac1 y Cdc42 después de la invasión y revierte los cambios producidos en el citoesqueleto de actina a su estado basal pasadas las 3 horas de infección (Fu and Galán, 1999; Galán and Zhou, 2000). SptP también contribuye a la evasión de la inmunidad innata del hospedador, debido a otra función como fosfatasa de tirosinas que media en la supresión de la degranulación de mastocitos locales (Choi et al., 2013).

### b. Alteración de las uniones estrechas

La barrera epitelial es un límite esencial que impide la entrada sin control de los elementos que transitan por el aparato digestivo. Los componentes básicos de esta barrera son estructuras que se forman entre las propias células epiteliales, que se denominan uniones

estrechas. Las uniones estrechas están especializadas y funcionan como barreras para la difusión de algunas proteínas de membrana y de lípidos entre los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática. Además, sirven como selladoras, de forma que se mantienen las células juntas y se impide el paso de, incluso, pequeñas moléculas.

Las uniones estrechas se componen de diferentes tipos de proteínas: aquí se encuentran las proteínas transmembrana claudinas y ocludinas; las proteínas periféricas intracelulares de membrana, proteínas ZO; y también otras proteínas asociadas. *Salmonella* modifica las uniones estrechas (**Figura I.11**) a través de la acción de cuatro efectores del T3SS-1: SipA, SopB, SopE y SopE2 (Boyle et al., 2006), consiguiendo que aumente la permeabilidad de la barrera epitelial. La desestabilización de estas uniones intercelulares permite la transmigración de PMNs desde la superficie basolateral a la apical, la fuga de fluido celular y el acceso de las bacterias a la superficie basolateral. Esta transmigración, sin embargo, puede ocurrir también sin necesidad de alterar las uniones estrechas, y esto lo consigue SopA, que actúa como una ligasa de ubiquitina HECT3 (Zhang et al., 2006b) que, además, posee un sitio de corte por la caspasa-3, necesario para su activación. El efector AvrA, también sustrato del T3SS-1, actúa, sorprendentemente, como un estabilizador de las uniones estrechas (Liao et al., 2008) bloqueando la vía de señalización de la quinasa Jun (JNK) (Zhang et al., 2015a).

### c. Respuestas nucleares

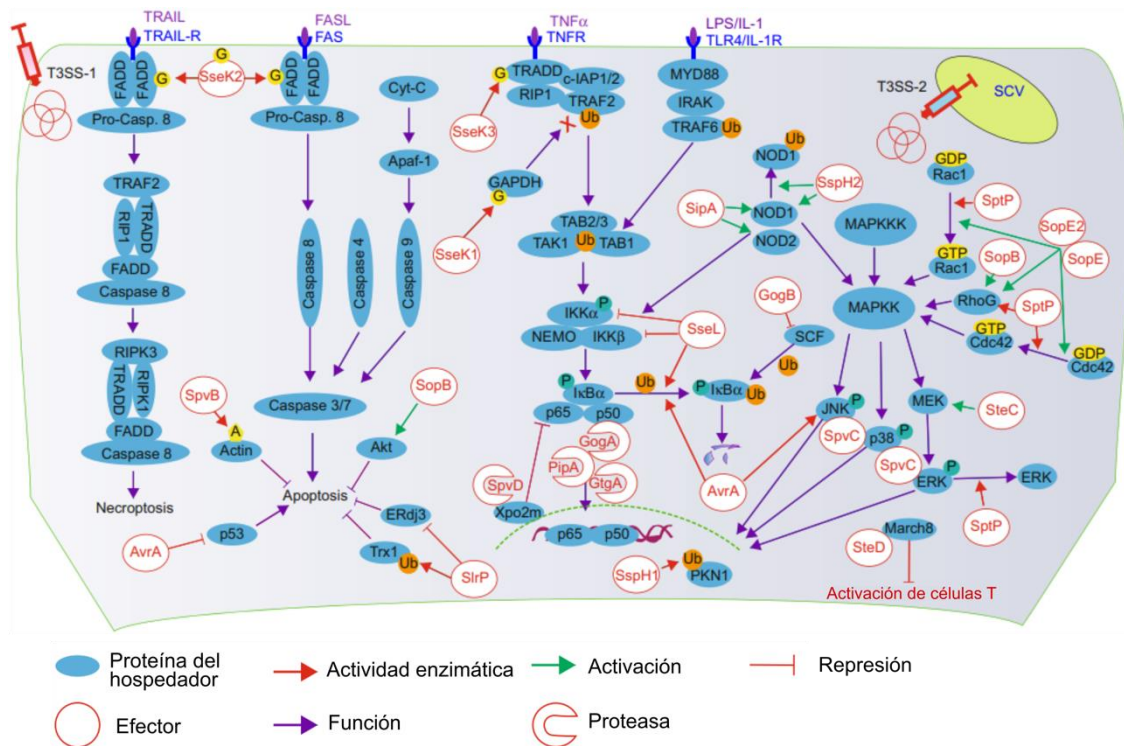
La infección por *Salmonella* provoca cambios globales en el transcriptoma de las células del hospedador (Eckmann et al., 2000). En estos cambios también influyen los efectores del T3SS, tal y como se puede apreciar en la **Figura I.12**. Los perfiles transcripcionales de células epiteliales infectadas con algunas estirpes mutantes de *Salmonella*, como el mutante *invA*, que carece de un T3SS-1 funcional, o un mutante *avrA slrP sopA sopB sopD sopE sopE2 sptP sspH1*, carente de efectores implicados en la invasión y otros procesos celulares, son muy similares a los perfiles de células sin infectar, lo que demuestra que la reprogramación llevada a cabo por la bacteria silvestre depende de uno o más efectores del T3SS-1 (Bruno et al., 2009). Un mutante *sipA sopA sopB sopD sopE sopE2* genera un patrón diferente de respuesta celular, relacionado con la regulación del citoesqueleto de actina y las vías del fosfatidilinositol, CCR3, Wnt y TGF- $\beta$ , cuando se compara con una estirpe silvestre en la infección de placas de Peyer bovinas (Lawhon et al., 2011). SopB, SopE y SopE2 activan GTPasas de la familia Rho que estimulan la respuesta inmune innata en células epiteliales al inducir las vías de señalización MAPK (en las que se incluyen ERK, JNK y p38) y NF- $\kappa$ B (Bruno et al., 2009; Hobbie et al., 1997; Patel and Galán, 2006). Estos establecen la secreción basolateral de la interleuquina IL-8, que es un requerimiento para la migración de PMNs (McCormick et al., 1993), provocando la inflamación.

SspH1 inhibe la expresión génica dependiente de NF- $\kappa$ B; y, junto con SptP, interfiere en la liberación de IL-8. Además, GogB, SseL y AvrA presentan actividad desubcutilasa, ya que bloquean la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  e inhiben la vía NF- $\kappa$ B (Collier-Hyams et al., 2002; Le Negrate et al., 2008; Ye et al., 2007). AvrA interfiere en numerosas vías de señalización *in vivo*, entre las que se incluyen mTOR, NF- $\kappa$ B, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, VEGF o MAPK (Liu et al., 2010). Un estudio *in vitro* relaciona el efector AvrA con la acetilación de p53

inducida por *Salmonella* en células epiteliales (Wu et al., 2010). Así mismo, AvrA restaura las uniones estrechas del epitelio con el fin de apagar las vías inflamatorias (Liao et al., 2008), que es un paso crítico para la supervivencia intracelular y la patogénesis de *Salmonella* (Haraga and Miller, 2003).

Otro estudio en macrófagos de pollo infectados con *S. Enteritidis* ha mostrado que SipA (del T3SS-1) y PipB (del T3SS-2) eliminan la respuesta innata del hospedador gracias a la modificación de los niveles en ciertas quimioquinas y RhoA (Zhang et al., 2008).

Por último, la expresión de SteA (un efector secretado por los dos sistemas de secreción tipo III, T3SS-1 y T3SS-2) en células epiteliales provoca el aumento de expresión de genes relacionados con la organización de la matriz extracelular, la regulación de la proliferación celular y la de vías de señalización mediadas por quinasas de serina y treonina. SteA también induce la represión de genes relacionados con procesos inmunes y con la regulación de la síntesis de purinas (Cardenal-Muñoz et al., 2014).



**Figura I.12. Respuestas nucleares inducidas por los efectores de *Salmonella*.** Se representan las vías de señalización en las que interfieren los diferentes efectores, que desembocan en la activación o inhibición de la respuesta inmune según el momento de la infección. Se representan las modificaciones que ejercen algunos efectores: A=ribosilación con ADP; P=fosforilación; G=Glicosilación; Ub=Ubiquitilación. Imagen adaptada de (El Qaidi et al., 2019).

#### d. Biogénesis de la SCV y la proliferación intracelular de *Salmonella*

Una vez que se ha internalizado, *Salmonella* establece su nicho en un fagosoma modificado, la SCV, que puede persistir desde unas horas a días (Bakowski et al., 2008). La biogénesis y la maduración de la SCV están característicamente acompañados por la formación de diferentes

tipos de túbulos originados por y conectados con la propia SCV (Schroeder et al., 2011). La SCV puede abarcar desde la membrana plasmática hasta una posición perinuclear (Ramsden et al., 2007), recluta varias GTPasas de la familia Rab (Smith et al., 2007) e interacciona con las vías de señalización endocíticas y exocíticas.

Hay dos efectores que destacan por su importancia en la etapa primaria de la biogénesis de la SCV: SopB y SptP. SopB, pese a translocarse por el T3SS-1, persiste al menos 12 horas tras la infección (Giacomodonato et al., 2007; Lawley et al., 2006). SopB es ubiquitilado por TRAF6 en la célula hospedadora, y esta modificación le permite realizar su actividad biológica (Ruan et al., 2014). Este efector es capaz de manipular, tanto de forma directa como de forma indirecta, el contenido de fosfatidilinositol de la membrana plasmática del hospedador (Steele-Mortimer et al., 2000; Terebiznik et al., 2002). Esto provoca la exclusión de Rab de la SCV y puede servir para retrasar su fusión con el lisosoma (Bakowski et al., 2008). Además, SopB recluta la GTPasa Rab5 a la membrana de la SCV (Mallo et al., 2008), gracias a lo cual acudirán otros reguladores importantes para el tráfico de membrana, que contribuirán al reclutamiento de Rab7 y LAMP1 a la SCV (Braun et al., 2010; Bujny et al., 2008). El rol que tiene SptP en la biogénesis de la SCV implica a su actividad GAP, ya que disminuye la actividad de Cdc42 y Rac1 y revierte la formación de pliegues de membrana (Fu and Galán, 1998); y también su actividad fosfatasa, ya que desfosforila a la ATPasa VCP (*valosin-containing protein*), un facilitador de la fusión de la membrana celular y la degradación de proteínas (Humphreys et al., 2009).

En la etapa intermedia del desarrollo de la SCV, ésta se dispone en una posición yuxtannuclear adyacente al centro organizador de microtúbulos, en las proximidades del aparato de Golgi. Para alcanzar esta posición, la SCV se desplaza por los microtúbulos con un movimiento mediado por dineína (Ramsden et al., 2007). Desde esta localización se asegura la replicación de *Salmonella* dentro de la SCV, y la bacteria es capaz de conseguir nutrientes y componentes de membrana (Salcedo and Holden, 2003). Para poder llevarse a cabo, este proceso requiere efectores de ambos T3SS: SipA y SopB del T3SS-1 y SifA, SseF y SseG del T3SS-2 (Boucrot et al., 2005; Deiwick et al., 2006). Una proteína motora asociada a actina, la miosina II no muscular, contribuye al posicionamiento de la SCV en un proceso en el que está involucrada la actividad fosfatasa de SopB (Wasylnka et al., 2008). La SCV acumula colesterol durante el proceso de maduración (Figura 1.12). Esta acumulación está relacionada con la replicación intracelular de la bacteria y parece ser dependiente de la SPI-2 (Catron et al., 2002). SseJ es capaz de esterificar el colesterol en la SCV, y este hecho también es importante para la supervivencia intracelular de *Salmonella* (Nawabi et al., 2008).

Horas después de la entrada de *Salmonella* en la célula hospedadora, se pueden observar filamentos de F-actina alrededor de la SCV, lo cual es importante para la replicación bacteriana (Méresse et al., 2001). SseI y SspH2 colocalizan con el citoesqueleto de actina gracias a su interacción con la filamina, que es una proteína de unión a actina del hospedador (Miao et al., 2003). SpvC, una toxina secretada por el T3SS-2, induce la despolimerización de la actina asociada a la vacuola (Browne et al., 2002; Lesnick et al., 2001), lo cual tiene un efecto negativo en la formación de los Sifs (*Salmonella-induced filaments*).

En la etapa tardía de la maduración de la SCV, se generan tres tipos de estructuras de membrana: los Sifs, SISTs (*Salmonella-induced secretory carrier membrane protein 3 (SCAMP3)*

*tubules*) y LNTs (*LAMP-1 negative tubules*), estos últimos observados más fácilmente en células epiteliales.

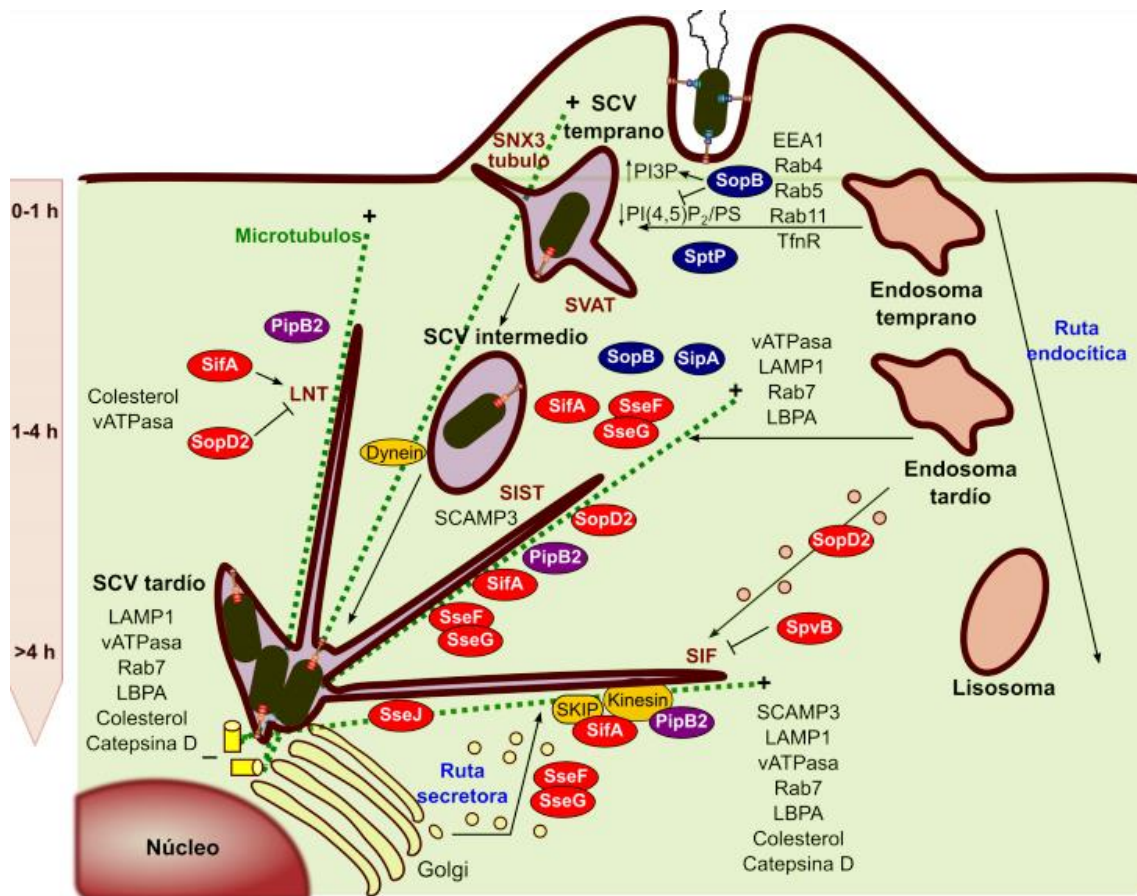
(i) Los Sifs son largas estructuras tubulares que se extienden desde la SCV. Son necesarios para el correcto posicionamiento de la SCV en la proximidad del aparato de Golgi, cerca de la región perinuclear del hospedador. Su aparición coincide con el inicio de la replicación bacteriana, pasadas varias horas de la invasión. Derivan de los compartimentos endocíticos tardíos, presentan la misma composición que las membranas de la SCV y se caracterizan porque contienen los marcadores LAMP, Rab7, colesterol, ATPasa vacuolar, ácido lisobifosfatídico y catepsina D (Drecktrah et al., 2008; Rajashekar et al., 2008; Steele-Mortimer, 2008). Los Sifs también son positivos para SCAMP3, lo cual indica que pueden incorporar membrana desde la vía secretora (Mota et al., 2009).

En la formación de los filamentos Sif están involucrados los efectores PipB2, SifA, SopD2, SseF, SseG y SseJ, mientras que SpvB parece tener un efecto negativo en su formación. SifA activa la GTPasa RhoA y se une a la proteína eucariótica SKIP (*SifA and kinesin-interacting protein*), para regular el nivel de la proteína motora de microtúbulos kinesina-1 en la SCV (Boucrot et al., 2005). PipB2 también recluta kinesina-1 (Henry et al., 2006), lo cual, junto con el complejo SifA-SKIP, promueve la elongación de los túbulos a lo largo de los microtúbulos. La formación de los Sifs requiere la presencia de una red de microtúbulos intacta (Brumell et al., 2002; Garcia-del Portillo et al., 1993).

Se ha propuesto que SseJ colabora con SifA en la formación de los Sifs (Ohlson et al., 2008) mediante la interacción con SKIP y RhoA (Schroeder et al., 2011). Como consecuencia, la composición de lípidos de la SCV varía y promueve la formación de túbulos. SopD2 se asocia a los endosomas tardíos y puede contribuir a la formación de Sifs mediante la dirección de vesículas endocíticas a la SCV y a los túbulos nacientes (Schroeder et al., 2010). SseF y SseG median el empaquetamiento de microtúbulos cerca de la SCV, lo que puede promover la fusión de vesículas agregadas en túbulos (Deiwick et al., 2006). También se ha observado relación molecular entre SipA (efector del T3SS-1) y SifA a nivel de dichos filamentos (Brawn et al., 2007).

(ii) Los SISTs también contienen SCAMP3 y efectores del T3SS-2 pero carecen de LAMP1 y otros marcadores endocíticos tardíos (Mota et al., 2009). La formación de los SIST requiere de los efectores PipB2, SifA, SopD2, SseF y SseG.

(iii) Los LNTs son el último tipo de túbulos surgidos en el estadio tardío de la maduración de la SCV. Carecen de LAMP1 y SCAMP3, aunque la presencia de efectores del T3SS-2 es muy alta. También se forman a lo largo de los microtúbulos de manera dependiente de la kinesina-1, pero no presentan los marcadores correspondientes de los Sifs y SISTs, excepto la ATPasa vacuolar. Se ha sugerido que SifA y SopD2 ejercen papeles contradictorios en la formación de estos túbulos, y que PipB2 está involucrado en su extensión (Schroeder et al., 2010).



**Figura I.13. Etapas de la formación de la vacuola que contiene a *Salmonella*.** Tras la invasión del hospedador, *Salmonella* establece un nicho intracelular dentro de un fagosoma modificado, conformando la SCV. La primera etapa de la biogénesis (0-1 h) de la SCV está guiada por los efectores del T3SS-1 (en azul) SopB y SptP y se caracteriza por la formación de túbulos SVATs y SNX3. El movimiento de la SCV a una posición yuxtanclear durante la etapa intermedia de desarrollo (1-4 h) requiere de la participación de los efectores SipA y SopB, también del T3SS-1, y los efectores SifA, SseF y SseG, del T3SS-2 (en rojo). Hay numerosos efectores involucrados en la etapa final de maduración y en el mantenimiento de la SCV. La replicación se inicia 4-6 h post-invasión, y se acompaña de la formación de diferentes tipos de túbulos conocidos como los Sifs, SISTs, y LNTs. El proceso de maduración también se caracteriza por la interacción con las rutas endocítica y secretora del hospedador. Imagen adaptada de (Ramos-Morales, 2012).

Por último, es necesario indicar que, aunque el nicho intracelular típico de *S. Typhimurium* sea la SCV, datos recientes muestran la existencia de dos subpoblaciones de *Salmonella* en la células epiteliales, una vacuolar y otra citosólica (Castanheira and García-del Portillo, 2017). La salida de la SCV lleva a una reprogramación transcripcional de las bacterias y a su replicación en el citosol (Malik-Kale et al., 2012). Finalmente, la célula epitelial muere por piroptosis y las bacterias salen al espacio extracelular, lo que proporciona un mecanismo potencial de diseminación (Knodler, 2015). En células epiteliales, algunas SCVs migran hacia la periferia de la célula hospedadora, en un movimiento centrífugo dependiente de microtúbulos, kinesina y el efector PipB2 del T3SS-2 (Knodler and Steele-Mortimer, 2005). Este movimiento se asocia con un descenso de los efectores SipA y SopB, del T3SS-1. Este desplazamiento, junto a la capacidad de la bacteria para escapar de la vacuola, permite a estos patógenos intracelulares



moverse de una célula a otra con el fin de repetir el ciclo de infección (Knodler et al., 2010; Szeto et al., 2009).

#### e. Muerte celular

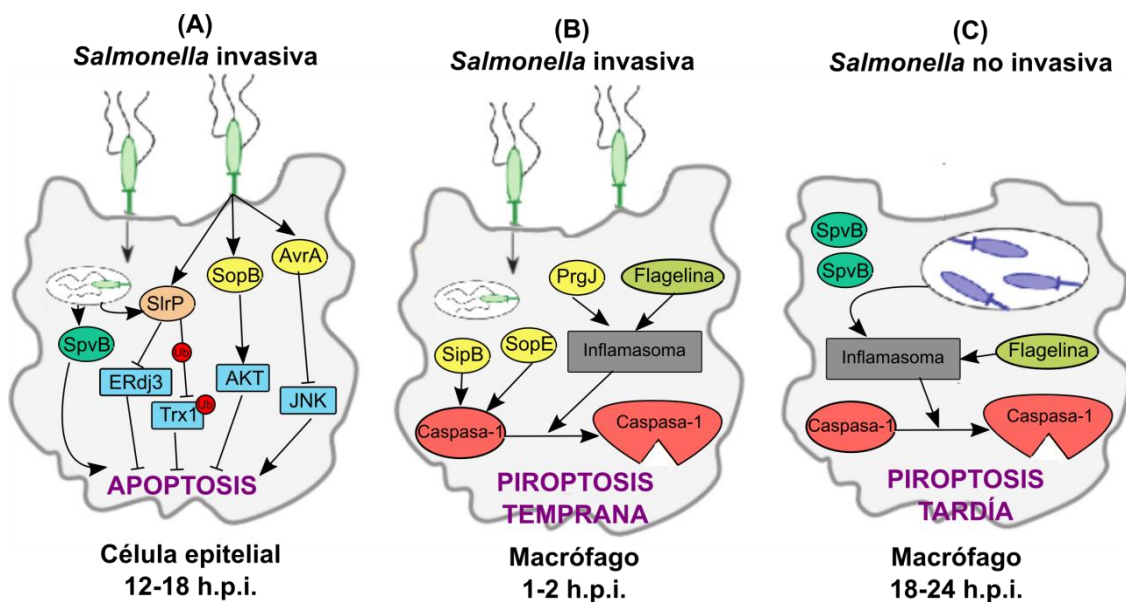
*Salmonella* puede causar la muerte celular en las células hospedadoras a través de mecanismos dependientes de los T3SS, aunque también hay algunos independientes (Guiney, 2005). Existen tres mecanismos de apoptosis dependientes de los T3SS: apoptosis en células epiteliales, piroptosis rápida de macrófagos dependiente del T3SS-1, y piroptosis retardada de macrófagos dependiente del T3SS-2 (Fink and Cookson, 2007) (**Figura I.14**)

(i) La apoptosis se define como una forma de muerte celular programada que puede iniciarse por distintos estímulos, tanto internos como externos. A lo largo del proceso apoptótico están involucradas diferentes caspasas, como la caspasa-3, que participa en procesos como la reducción del potencial de membrana mitocondrial, exposición de fosfatidilserina en la superficie celular, segmentación de la citoqueratina, condensación nuclear, fragmentación del ADN y mantenimiento de una membrana plasmática intacta. *Salmonella* puede promover o prevenir la apoptosis de la célula hospedadora en función de sus intereses, y para ello cuenta con efectores pro- y anti-apoptosis. Por ejemplo SlrP, que puede translocarse por ambos T3SS, contribuye a la muerte celular epitelial mediante su interacción con la tioredoxina humana, a la que ubiquitila, y con la chaperona del retículo endoplásmico ERdj3 (Bernal-Bayard and Ramos-Morales, 2009; Bernal-Bayard et al., 2010). Otro efector relacionado con la apoptosis es SpvB, sustrato del T3SS-2 (Paesold et al., 2002). Por otra parte, los efectores AvrA y SopB pueden tener actividad antiapoptótica mediante la represión de la vía apoptótica JNK (Wu et al., 2012) y la activación de Akt, respectivamente (Steele-Mortimer et al., 2000). Los efectos antiapoptóticos serían los responsables del retraso en la apoptosis de 12-18 h tras la entrada de *Salmonella* (Kim et al., 1998), lo que permitiría al patógeno establecer un nicho intracelular estable y evitar la inmunidad adaptativa (Wu et al., 2012). Más adelante, la fagocitosis de cuerpos apoptóticos repletos de *Salmonella* por parte de los macrófagos contribuiría a la diseminación sistémica de la bacteria (Guiney, 2005).

(ii) La piroptosis rápida es otro tipo de muerte celular programada que se produce en macrófagos y puede ser inducida por el T3SS-1 de *Salmonella*. La piroptosis rápida se detecta en las primeras 1-2 horas de infección, y se puede observar también en células dendríticas (Monack et al., 2001; van der Velden et al., 2003). Este proceso requiere del ensamblaje de un complejo molecular denominado inflamasoma. Este complejo supone una plataforma de señalización para activar las caspasas específicas de inflamación. La piroptosis rápida es un proceso dependiente de la caspasa-1 (Brennan and Cookson, 2000; Fink and Cookson, 2005). La caspasa-1 es un mediador central de la inmunidad innata que no se activa en la apoptosis, pero sí en esta ocasión. Su activación da lugar a la producción de IL-1 $\beta$  e IL-18, lisis celular rápida y la liberación de contenido intracelular pro-inflamatorio (Bierschenk et al., 2017; Cookson and Brennan, 2001). Hay varias proteínas secretadas por el T3SS-1 o relacionadas con él que participan en la activación del inflamasoma y la caspasa-1: la translocasa SipB, que interacciona directamente con la caspasa-1 (Hersh et al., 1999); PrgJ, un componente del anillo interno, estimula el inflamasoma NLRC4; la flagelina, que podría actuar también como inductor

del inflammasoma NLRC4 tras su translocación a la célula hospedadora (Franchi et al., 2006; Miao et al., 2006; Sun et al., 2007); y el efector SopE, que activa a la caspasa 1 gracias a su actividad intercambiadora de nucleótidos de guanina (Hoffmann et al., 2010; Müller et al., 2009).

(iii) **Piroptosis retardada**: durante la infección sistémica de *Salmonella* se reprime la expresión del T3SS-1 y de la flagelina, de modo que no se activa la caspasa-1 en los macrófagos y, en consecuencia, no se produce una muerte celular rápida en dichas células (Schlumberger and Hardt, 2006; Stewart et al., 2011). Sin embargo, tras 18-24 horas de infección tiene lugar una piroptosis retardada de macrófagos (Monack et al., 2001; van der Velden et al., 2003). En este tipo de muerte celular *Salmonella* activa dos inflammasomas: NLRC4, cuya activación requiere del T3SS-2 y la flagelina; y NLRP3, cuya señal de activación no se ha determinado. Además, otras características propias de este proceso son producción de IL-1 $\beta$ , rotura de ADN y lisis celular (Broz et al., 2010; Libby et al., 2000; Rytkönen et al., 2007). Algunos autores han observado que la piroptosis retardada de macrófagos tiene características similares al proceso apoptótico descrito para las células epiteliales (Guiney and Fierer, 2011).



**Figura I.14. Muerte de la célula hospedadora inducida por *Salmonella*.** (A) **Apoptosis.** *Salmonella* induce la apoptosis en células epiteliales tras 12-18 horas de infección. Se ha sugerido que los efectores AvrA y SopB (secretados a través del T3SS-1), SpvB (secretado por el T3SS-2) y SirP (secretado por ambos T3SS) participan en este proceso a través de diferentes mecanismos. UB=ubiquitina. (B) **Piroptosis rápida.** *Salmonella* induce la piroptosis rápida en macrófagos por la activación del T3SS-1. Esta forma de muerte celular depende de la activación de la caspasa-1, y necesita de la activación del efector SipB, flagelina y la proteína PrgJ. (C) **Piroptosis retardada.** *Salmonella* no invasiva produce piroptosis retardada en macrófagos infectados, mediante la secreción a través del T3SS-2 de flagelina y los efectores SpvB y SseI. Imagen adaptada de (Ramos-Morales, 2012)

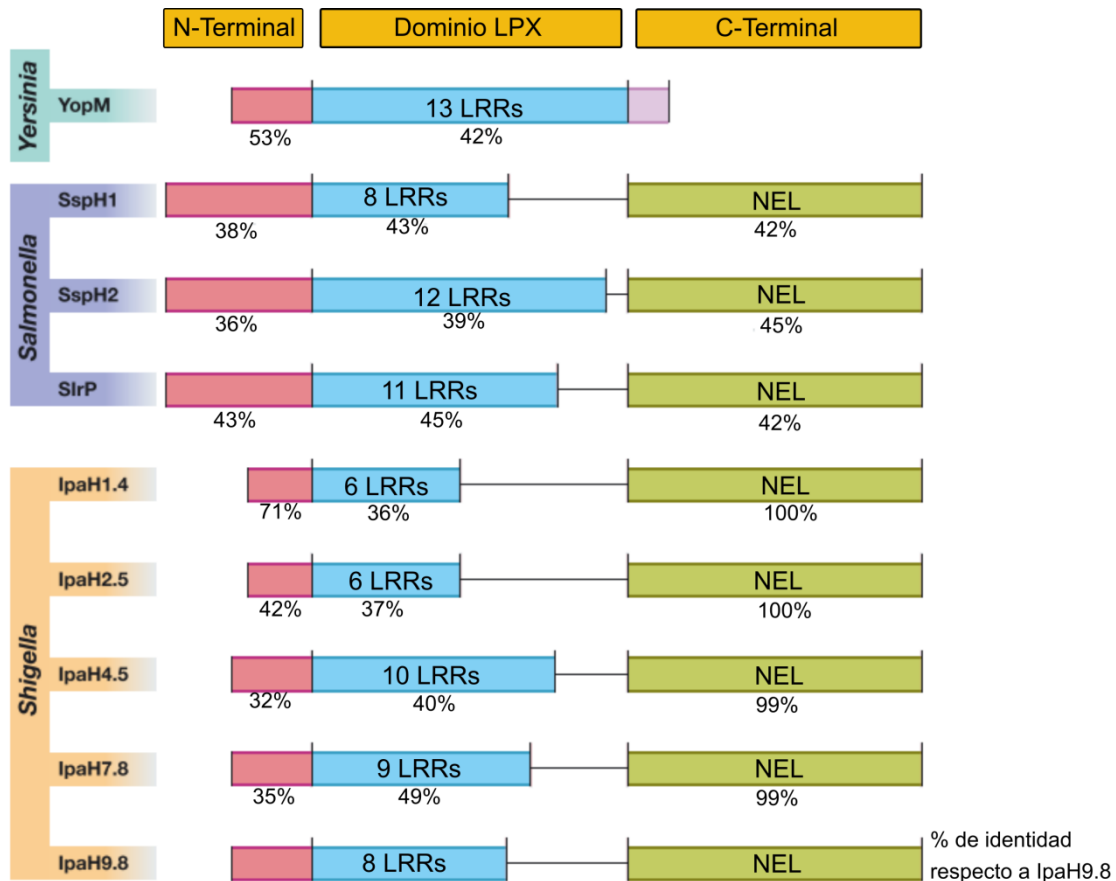
## 9. SLRP

El gen *slrP* fue identificado en la búsqueda de factores genéticos que pudieran ser relevantes para determinar la gama de hospedadores de un serovar concreto de *S. enterica* (Tsolis et al., 1999). Se comparó la virulencia de mutantes de *S. Typhimurium* en dos hospedadores diferentes, ratón y ternero. Los mutantes se generaron mediante la metodología STM (*signature-tagged mutagenesis*), que se basa en la inserción de un transposón etiquetado individualmente. Así, de entre los mutantes que producían infección atenuada, un gen portador de la inserción se localizó en una región de 2,9 kb de ADN que tenía características propias de una adquisición horizontal. Al analizar su secuencia, se comprobó que este gen codificaba una proteína que contenía varias repeticiones de un motivo rico en leucinas, LRR. De ahí que finalmente se denominara a este gen *slrP* (del inglés *Salmonella leucine-rich repeat protein*).

El gen *slrP*, que está localizado fuera de las islas de patogenicidad del genoma de *S. enterica*, codifica una proteína de 765 aminoácidos, en la que podemos distinguir tres dominios (**Figura I.15**):

- Un dominio N-terminal que contiene la secuencia señal para la secreción de la proteína y su translocación a la célula hospedadora. Esta secuencia es similar a la que se encuentra en otros efectores como SspH1, SspH2, SseI, SseJ, SifA y SifB. SlrP se secreta a través de los dos sistemas de secreción tipo III de *Salmonella*, T3SS-1 y T3SS-2 (Miao and Miller, 2000).
- Un dominio central, o dominio LPX, que contiene 11 copias de motivos LRR, que suelen estar implicados en la interacción con otras proteínas (Kobe and Kajava, 2001).
- Un dominio C-terminal NEL (*Novel E3 Ubiquitin Ligase*) que tiene actividad ligasa de ubiquitina (Bernal-Bayard and Ramos-Morales, 2009).

También se encuentran repeticiones del dominio LPX en otros efectores: SspH1 y SspH2 de la propia *Salmonella*; YopM, de *Yersinia spp*; e IpaH y sus derivados, de *Shigella flexneri* (Miao et al., 1999). Todos ellos componen la familia LPX, un subtipo de la superfamilia de proteínas LRR, caracterizado por la modulación del sistema de ubiquitilación del hospedador gracias a su dominio E3 ligasa de ubiquitina, a excepción de YopM (Norkowski et al., 2018).



**Figura I.15. Representación esquemática de los dominios de SlrP y efectores relacionados.** Se muestran los porcentajes de similitud de los diferentes dominios respecto a su homólogo en IpaH9.8, de *Shigella flexneri*. Imagen adaptada de (Norkowski et al., 2018).

El efector SlrP ha sido estudiado previamente en nuestro laboratorio. Así, se ha demostrado que SlrP interacciona con la tiorredoxina 1 (Trx1), además de poder utilizarla como sustrato de su actividad ligasa de ubiquitina (Bernal-Bayard and Ramos-Morales, 2009). Como resultado de la expresión de SlrP en células HeLa, se inhibe la actividad de Trx1, favoreciendo la muerte celular. También se ha demostrado que SlrP interacciona con la chaperona humana ERdj3, del retículo endoplásmico (Bernal-Bayard et al., 2010), impidiendo la unión de esta proteína a otros sustratos desnaturalizados para ejercer su función.

Además, se ha resuelto la estructura tridimensional del complejo SlrP-Trx1 (Zouhir et al., 2014). La resolución de esta estructura permitió describir un mecanismo de autoinhibición de la ligasa de ubiquitina, aportando una nueva visión de cómo SlrP puede contribuir a la virulencia de *Salmonella*.

Se ha observado en ratones que, durante el transcurso de la infección, SlrP es capaz de prevenir la anorexia en el hospedador, inhibiendo la activación del inflammasoma y con ello la maduración de la IL-1 $\beta$  (Rao et al., 2017). También, en coordinación con otros efectores de *Salmonella*, SlrP interfiere en la quimiotaxis y la migración de células dendríticas (McLaughlin et al., 2014).

## 10. EFECTORES SSEK

La proteína SseK1 se identificó como un efector que se transloca por los T3SS de *S. Typhimurium* gracias a su similitud con otros efectores que se conocían previamente: Z4328, de *E. coli* enterohemorrágica; y NleB, de *Citrobacter rodentium* (Kujat Choy et al., 2004). *S. enterica* cuenta con dos parálogos de SseK1: SseK2, que alcanza un 61% de identidad con SseK1 en la secuencia de aminoácidos (Kujat Choy et al., 2004); y SseK3, que está codificada en el profago ST64B y cuya identidad con SseK2 es de un 75% (Brown et al., 2011), mientras que con SseK1 es de un 55% (Esposito et al., 2018).

Estos tres efectores pertenecen a una familia de efectores con actividad glicosiltransferasa con un dominio Asp-x-Asp (DxD) (Li et al., 2013). En esta familia se incluyen efectores de otros organismos, como el ya mencionado NleB, además de NleB1 y NleB2 de *E. coli* enterohemorrágica y enteropatogénica (Araujo-Garrido et al., 2020a). NleB1 puede modificar proteínas con dominios de muerte, como las proteínas TRADD (*TNFR1-associated death domain protein*) y FADD (*FAS-associated death domain protein*), mediante la adición de N-acetilglucosamina en residuos de arginina. Esta modificación bloquea las interacciones entre los dominios de muerte e interfiere en la señalización NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa B*), la necroptosis y la apoptosis mediada por la caspasa 8 (Li et al., 2013; Pearson et al., 2013).

De un modo análogo, SseK1 y SseK3 también reprimen la señalización NF- $\kappa$ B y la muerte celular del hospedador (Günster et al., 2017). SseK1 modifica a FADD (Günster et al., 2017) y a TRADD (Li et al., 2013), siendo esta última modificación de especial relevancia para el desarrollo de la patogénesis de *Salmonella* (Gong et al., 2020). SseK3 realiza una modificación a un nivel mucho menor que SseK1 de TRADD y no se detecta que SseK3 pueda modificar a FADD, mientras que respecto a la actividad transferasa de N-acetilglucosamina de SseK2 existen resultados contradictorios (El Qaidi et al., 2017; Günster et al., 2017).

La hipótesis de partida con la que se trabajó previamente en nuestro laboratorio fue que SseK1, tras translocarse a través del T3SS, es capaz de interactuar con diferentes proteínas del hospedador, las cuales podrían ser objeto de su actividad transferasa de N-acetilglucosamina. Para poder identificar estas proteínas del hospedador, se realizó un escrutinio de doble híbrido en levaduras utilizando SseK1 como proteína cebo, enmarcado en la tesis del doctor Baisón Olmo.

Para la realización de este escrutinio, se fusionó SseK1 de *S. enterica* serovar Typhimurium al dominio de unión a ADN del factor de transcripción bacteriano LexA, en el vector pLEX10. Una vez se obtuvo la estirpe L40 de *Saccharomyces cerevisiae* que portaba esta construcción, se transformó con una genoteca de ADNc de células Jurkat (línea celular humana de linfocitos) fusionada al dominio de activación del factor transcripcional Gal4, en el vector pGAD1318. Como resultado de ese escrutinio se obtuvieron los genes representados en la Tabla I.3.

**Tabla I.3. Genes humanos identificados en el escrutinio de doble híbrido con SseK1.** (Tesis Doctoral de Fernando Baisón Olmo, 2016).

Nº de candidatos	Gen	Descripción del producto	Aminoácidos incluidos
116	<i>TBCB</i>	<i>Tubulin-folding cofactor B</i>	1-244 4-244 29-244
7	<i>ZBTB16</i>	<i>Zinc finger and BTB domain-containing protein 16</i>	420-673 448-673 552-673
3	<i>H3.3B</i>	<i>Histone H3.3 isoform B</i>	1-136 40-136
1	<i>H3.3A</i>	<i>Histone H3.3 isoform A</i>	18-136
1	<i>CENPA</i>	<i>Histone H3-like centromeric protein A</i>	1-140
1	<i>HIRIP3</i>	<i>HIRA-interacting protein 3</i>	340-556
1	<i>XRCC6</i>	<i>X-ray repair cross-complementing protein 6</i>	335-609

# Objetivos

---





En *S. enterica* se encuentran más de 40 proteínas efectoras implicadas en el proceso de infección, cada una de ellas con diferentes funciones y utilizadas en diferentes etapas. El propósito de esta Tesis es realizar una contribución al estudio de dos de esos efectores específicamente, SseK1 y SlrP. Basado en el trabajo previo realizado en nuestro laboratorio, se exploró un posible nuevo efecto de SseK1 en la célula hospedadora, así como su parálogo SseK3, diferente a lo que se ha descrito hasta el momento. Por otra parte, aunque ya se conocen dianas y funciones de SlrP, esperamos profundizar en el conocimiento de sus consecuencias globales en la célula hospedadora mediante la detección de otras dianas o variaciones en la expresión de genes.

Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Verificar las interacciones detectadas previamente de SseK1 con proteínas humanas y analizar los efectos fisiológicos de la expresión del efector en la célula hospedadora.
2. Realizar un escrutinio genético para la identificación de proteínas humanas que interactuaran y sirvieran de dianas para el efector SlrP de *Salmonella*.
3. Analizar los efectos a nivel transcriptómico de la expresión de SlrP durante la infección.



# **Materiales y métodos**

---



# 1. MATERIAL BIOLÓGICO

## 1.1 Estirpes bacterianas

Todas las estirpes de *E. coli* y *S. enterica* serovar Typhimurium utilizadas en esta tesis aparecen en la Tabla M.1. Todas las estirpes de *S. enterica* derivan de la estirpe ATCC 14028, virulenta en humanos y ratones, también conocida simplemente como 14028.

Tabla M.1. Estirpes bacterianas usadas en esta tesis.

Estirpe	Características	Referencia
<b><i>E. coli</i></b>		
<b>DH5<math>\alpha</math></b>	<i>supE44 <math>\Delta</math>lacU169 (<math>\Phi</math>80 lacZ<math>\Delta</math>M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(Hanahan, 1983)
<b>BL21(DE3)</b>	F' <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub>- m<sub>B</sub>-;</i> estirpe <i>E. coli</i> B), con DE3, un profago $\lambda$ que lleva el gen de la ARN polimerasa T7	Stratagene
<b>HB101</b>	F' <i><math>\Delta</math>(mcrC-mrr) hsdS20 (r<sub>B</sub>- m<sub>B</sub>-) recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galk2 xyl-5 mtl-1 rpsL20 (Sm<sup>R</sup>) glnV44 <math>\lambda</math>-</i>	(Boyer and Roulland-Dussoix, 1969)
<b>XL1-Blue</b>	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 <math>\Delta</math>lac-pro/F' proAB lacIq lacZ<math>\Delta</math>M15 Tn10, Tc<sup>R</sup></i>	(Bullock et al., 1987)
<b><i>S. enterica</i> serovar Typhimurium</b>		
<b>14028</b>	Estirpe silvestre	ATCC
<b>SV5031</b>	<i><math>\Delta</math>slrP</i> , Km <sup>R</sup>	Colección del laboratorio
<b>SV7071</b>	<i>sseK1::3xFLAG</i> , Km <sup>R</sup>	(Baisón-Olmo et al., 2015)

### Congelación y descongelación de estirpes bacterianas

Se añadieron 70  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO) a 1 mL de cultivo bacteriano en fase estacionaria, guardando el vial a -80°C. Los viales se descongelaron lentamente en hielo.

## 1.2 Estirpes de levadura

En esta tesis se ha utilizado la estirpe L40 de *Saccharomyces cerevisiae*, cuyo genotipo es *MAT $\alpha$  trp1 leu2 his3 LYS2::lexA-HIS3 URA3::lexA-lacZ*.

### Congelación y descongelación de estirpes de levaduras

Se añadieron 500  $\mu$ L de glicerol al 50% a 700  $\mu$ L de cultivo saturado de levaduras. El vial se almacenó a -80°C. Las estirpes se congelaron en medio rico, a no ser que fueran portadoras de un plásmido en cuyo caso se congelaron en medio mínimo SD suplementado con los requerimientos apropiados. Los viales se descongelaron lentamente en hielo.

## 1.3 Líneas de células de mamífero

En este estudio se han empleado diferentes líneas celulares de mamífero:

- i. HeLa (línea que proviene de células epiteliales humanas; ECACC nº 93021013).
- ii. HEK293T (línea que proviene de células embrionarias de riñón humano; ECACC nº 12022001).

### Congelación y descongelación de células de mamífero

Se pusieron en cada vial de congelación entre  $5 \times 10^6$  y  $10^7$  células, resuspendidas en 1.5 mL de medio de congelación<sup>1</sup>. Cada vial se mantuvo 2 horas a  $-20^\circ\text{C}$ , 24h a  $-80^\circ\text{C}$  y finalmente se almacenó en una atmósfera de nitrógeno líquido.

Para la descongelación, los viales se introdujeron en agua a temperatura ambiente durante pocos minutos (hasta la descongelación). Después, las células se diluyeron en 10 mL de medio de cultivo DMEM, se centrifugaron 10 minutos a 1000 rpm y se resuspendieron en medio fresco para transferirse a una placa de cultivo.

<sup>1</sup>**Medio de congelación para células de mamífero:** 90% de suero fetal bovino (FBS) y 10% de DMSO.

## 2. MEDIOS, SOLUCIONES Y CONDICIONES DE CULTIVO

### 2.1 Bacterias

#### 2.1.1 Condiciones de crecimiento bacteriano

Las condiciones habituales para el cultivo de bacterias fueron a  $37^\circ\text{C}$  de temperatura, o  $30^\circ\text{C}$  en algunos casos de inducción de proteínas, con agitación de 200 rpm.

#### 2.1.2 Soluciones y medios para bacterias

Se utilizó el medio Luria-Bertani (LB)<sup>2</sup> como medio líquido estándar (Maloy, 1990). El agar se añadió a los medios a una concentración de 15 g/L para el medio sólido.

<sup>2</sup>**Medio LB:** 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl por cada litro de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada

En la Tabla M.2 se muestran los antibióticos y otros compuestos químicos utilizados en los medios de cultivo, junto con sus concentraciones finales.

**Tabla M.2. Concentración final de antibióticos y otros compuestos químicos utilizados en los medios de cultivo bacterianos.**

Compuesto	Mecanismo de acción	Preparación	Concentración final (µg/mL)
<b>Antibióticos</b>			
<b>Ampicilina (Ap)</b>	Bactericida. Inhibición de la síntesis de la pared celular.	100 mg/mL (H <sub>2</sub> O)dd) Esterilizar por filtración Almacenado a 4°C	100
<b>Cloranfenicol (Cm)</b>	Bactericida o bacteriostático. Inhibición de la síntesis proteica.	20 mg/mL en etanol 96% Almacenado a -20°C	20
<b>Kanamicina (Km)</b>	Bactericida. Inhibición de la síntesis proteica.	50 mg/mL (H <sub>2</sub> O)dd) Esterilizar por filtración Almacenado a 4°C	50
<b>Tetraciclina (Tc)</b>	Bacteriostático a las dosis habituales; bactericida a altas dosis. Desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, inhibición de la síntesis proteica y alteración en la membrana plasmática.	4 mg/mL en etanol 70% Esterilizar por filtración Almacenado en oscuridad y a -20°C	20
<b>Otros compuestos</b>			
<b>IPTG</b>	Análogo no hidrolizable de alolactosa, para inducir expresión génica bajo el control del operón <i>lac</i>	1M (H <sub>2</sub> O)dd) Esterilizar por filtración Almacenado a -20°C	1 mM
<b>X-Gal</b>	Hidrolizado por la β-galactosidasa a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol. Este último, al oxidarse, genera un compuesto azul insoluble	20 mg/mL (en dimetilformamida) Almacenado en oscuridad y a -20°C	40

## **2.2 Levaduras**

### **2.2.1 Condiciones de cultivo de levaduras**

Las levaduras se cultivaron a 30°C. En el caso de cultivos en medio líquido, se hizo además con agitación (200 rpm) para favorecer la aireación del cultivo.

### **2.2.2 Soluciones y medios para levaduras**

El medio rico para cultivar las levaduras fue YPD<sup>4</sup>.

Como medio de selección para diferentes transformantes, se empleó el medio SD suplementado con *drop-out*, que es una mezcla de todos los posibles suplementos a excepción de aquellos marcadores nutricionales con los que se pretende realizar la selección. Habitualmente se empleó una mezcla comercial (Formedium) a la concentración indicada por el fabricante, mientras que en otras ocasiones fue necesario añadir suplementos preparados

en el laboratorio según se indica en la Tabla M.3. Los medios sólidos se prepararon añadiendo un 2% de agar antes de ser autoclavados.

**Tabla M.3. Suplementos para el medio mínimo de levaduras.**

Concentración de los suplementos	Volumen añadido a 1L de medio mínimo
Adenina 0.2%	10 mL
Triptófano 1%	2 mL
Histidina 1%	2 mL
Leucina 2%	6 mL

<sup>4</sup>**Medio rico YPD:** 1% de extracto de levadura, 2% de bactopectona y 2% de glucosa.

<sup>5</sup>**Medio mínimo SD:** base nitrogenada para levaduras sin aminoácidos ni sulfato amónico (Difco) 1.5 g/L, sulfato amónico 1.5 g/L, glucosa 20 g/L.

## **2.3 Líneas celulares de mamífero**

### **2.3.1 Condiciones de cultivo**

Las líneas celulares de mamífero se cultivaron en un incubador *Biotech Galaxy* a 37°C en una atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5%. Se emplearon placas de cultivo de 10 cm de diámetro (con 10 mL de medio de cultivo), placas de cultivo de 15 cm de diámetro (con 20 mL de medio de cultivo), placas multipocillos de 6 pocillos (3 mL por pocillo) o placas multipocillos de 24 pocillos (1 mL por pocillo).

Las dos líneas celulares con las que se trabajó, se subcultivaron dos veces por semana. Las células HeLa y HEK293T, al ser adherentes, se despegaron mediante tripsinización, retirando el medio de cultivo, lavando las células dos veces con tampón fosfato salino (PBS<sup>6</sup>) y añadiendo 1 mL de tripsina (previamente diluido el stock 10X en PBS). Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 10 minutos y se recogieron en medio fresco.

<sup>6</sup>**PBS 10X:** NaCl 1.37 M, KCl 27 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 43 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 14 mM. Ajustar el pH a 7.3.

### **2.3.2 Soluciones y medios de cultivo para células de mamífero**

El medio de cultivo utilizado para las líneas celulares de mamífero fue el medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, Biowest), suplementado con un 10% de suero fetal bovino inactivado<sup>7</sup>, L-glutamina 2mM y un cóctel que incluye los antibióticos penicilina y estreptomina, a 100 µg/mL. En los experimentos de infección con *Salmonella* no se añadieron antibióticos al medio.

<sup>7</sup>**Inactivación del suero fetal bovino:** el suero se incubó a 56°C durante 30 minutos para inactivar las proteínas del complemento, las cuales podrían producir la lisis celular.



### 3. MANIPULACIÓN Y TRANSFERENCIA DE ADN

#### 3.1 Plásmidos

Los plásmidos utilizados en esta tesis se describen en la Tabla M.4.

**Tabla M.4. Plásmidos utilizados en esta tesis.** El prefijo pIZ está registrado a nombre del profesor J. Casadesús en el *Plasmid Reference Center*, Universidad de Stanford, California.

Plásmido	Características	Referencia
pBABEpuro	Vector para transfecciones, Ap <sup>R</sup> , Puro <sup>R</sup>	(Morgenstern and Land, 1990)
pCS2+3xHA	Vector de fusión con 3xHA, Ap <sup>R</sup>	F. Romero
pEGFPC1	Vector de fusión con GFP, Km <sup>R</sup>	<i>Clontech</i>
pGAD1318	Vector de doble híbrido en levaduras, Ap <sup>R</sup>	(Van Aelst, 1998)
pGEX4-T-1	Vector de fusión con GST, Ap <sup>R</sup>	<i>GE Healthcare</i>
pIZ1623	pGEX-4T-3-SlrP	(Bernal-Bayard and Ramos-Morales, 2009)
pIZ1628	pLEX10-SlrP	Colección del laboratorio
pIZ1710	pGADT7-Trx1	Colección del laboratorio
pIZ1712	pGEX-4T-1-Trx1	(Bernal-Bayard and Ramos-Morales, 2009)
pIZ1776	pQE30-SlrP	Colección del laboratorio
pIZ2047	pBABEpuro-SseK1-3xFLAG	(Araujo-Garrido et al., 2020b)
pIZ2203	pLEX10-SseK1	(Araujo-Garrido et al., 2020b)
pIZ2260	pGAD1318-TBCB	(Araujo-Garrido et al., 2020b)
pIZ2331	pGEX-4T-2-ZBTB16	Este trabajo
pIZ2336	pEGFPC1-SseK1	(Araujo-Garrido et al., 2020b)
pIZ2339	pGEX-4T-3-SseK1	(Araujo-Garrido et al., 2020b)
pIZ2352	pCS2-3xHA-ZBTB16	Este trabajo
pIZ3399	pGEX-4T-2-MITD1	Este trabajo
pIZ3400	pGEX-4T-2-PLK4	Este trabajo
pIZ3401	pGEX-4T-2-PPP1R7	Este trabajo
pIZ3402	pGEX-4T-2-RABIF	Este trabajo
pIZ3403	pGEX-4T-2-SNRPD2	Este trabajo
pIZ3405	pLEX10-SseK2	(Araujo-Garrido et al., 2020b)
pIZ3406	pLEX10-SseK3	(Araujo-Garrido et al., 2020b)
pIZ3423	pCS2-3xHA-TBCB	(Araujo-Garrido et al., 2020b)
pIZ3495	pGEX-4T-2-LSM2	Este trabajo
pIZ3509	pGEX-4T-1-TBCB	(Araujo-Garrido et al., 2020b)
pIZ3510	pGEX-4T-1-TBCB(1-125)	(Araujo-Garrido et al., 2020b)
pIZ3511	pGEX-4T-1-TBCB(126-244)	(Araujo-Garrido et al., 2020b)
pIZ3515	pGEX-4T-1-TBCB(R196A)	Este trabajo
pIZ3516	pGEX-4T-1-SseK2	(Araujo-Garrido et al., 2020b)
pIZ3517	pGEX-4T-1-SseK3	(Araujo-Garrido et al., 2020b)

pIZ3518	pGEX-4T-3-SseK1(D223A/D225A)	(Araujo-Garrido et al., 2020b)
pIZ3519	pGEX-4T-1-SseK3(D226A/D228A)	(Araujo-Garrido et al., 2020b)
pIZ3521	pEGFPC1-SseK3	Este trabajo
pIZ3522	pEGFPC1-SseK1(D223A/D225A)	(Araujo-Garrido et al., 2020b)
pIZ3523	pEGFPC1-SseK3(D226A/D228A)	Este trabajo
pIZ3500	pLEX10-SseK1(D223A/D225A)	Este trabajo
pIZ3507	pLEX10-SseK3(D226A/D228A)	Este trabajo
pLEX10	Vector de doble híbrido en levaduras, Ap <sup>R</sup>	(Selig et al., 1997)

### **3.2 Extracción de ADN plasmídico**

#### **3.2.1 Extracción de ADN plasmídico de *E. coli***

Para la extracción de ADN plasmídico se utilizaron diferentes sistemas comerciales: *DNA-spin<sup>TM</sup> Plasmid DNA Purification Kit*, suministrado por iNtRON Biotechnology; *GeneElute<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit*, suministrado por Sigma Aldrich Co.; y *NucleoSpin<sup>TM</sup> Plasmid*, suministrado por Macherey-Nagel. Con todos los sistemas comerciales se siguieron las instrucciones aportadas por el fabricante correspondiente.

#### **3.2.2 Extracción de ADN plasmídico de *S. cerevisiae***

Se realizaron minipreparaciones a partir de 4.5 mL de cultivo saturado en medio selectivo líquido. Las levaduras se recogieron en microtubos durante tres centrifugaciones sucesivas en una microcentrífuga de sobremesa a 13000 rpm durante un minuto. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 100 µL de tampón TE<sup>8</sup>. Se añadieron 200 µL de solución de lisis<sup>9</sup>, 200 µL de una mezcla fenol-cloroformo-isoamílico (preparada en proporción 25:24:1) y 0.3 g de bolas de vidrio<sup>10</sup>, y se agitó durante 2 minutos en un agitador de vórtice. Se centrifugó 5 minutos a 13000 rpm y se transfirió la fase acuosa a un nuevo microtubo. Se añadieron 0.1 volúmenes de acetato de potasio 5 M y 2 volúmenes de etanol 100% frío. Tras 2 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó 5 minutos a 13000 rpm y el sedimento se lavó con etanol al 70%. Una vez seco, el sedimento se resuspendió en 50 µL de H<sub>2</sub>Odd.

1 µL de esta preparación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* mediante electroporación.

<sup>8</sup>**Tampón TE:** Tris 10 mM, EDTA 1 mM.

<sup>9</sup>**Solución de lisis:** Tritón X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris (pH 8) 10 mM, EDTA 1 mM.

<sup>10</sup>**Bolas de vidrio:** tienen un diámetro de 0.45-0.52 mm. Las bolas se lavan con ácido nítrico durante una noche y posteriormente se lavan varias veces con H<sub>2</sub>Odd y se dejan secar en el horno.

### **3.3 Digestión y ligación de fragmentos de ADN**

Las endonucleasas de restricción se obtuvieron de las compañías *Roche Diagnostics GmbH*, *Takara*, *New England Biolabs* y *Promega Biotech*. Para cada endonucleasa utilizada, se siguieron las recomendaciones del fabricante correspondiente.

Para ligar fragmentos de ADN se usó 1 U de ADN ligasa de T4 (1 U/ $\mu$ L, Roche) en el tampón suministrado por el fabricante. Habitualmente, la mezcla se incubó un mínimo de 12 horas a 16°C.

### **3.4 Electroforesis de ADN en gel de agarosa**

La electroforesis en gel de agarosa sumergido en tampón TAE<sup>11</sup> se utiliza para varios fines: determinación de la eficiencia de extracciones de ADN, observación de patrones de corte y estimación de la eficacia tras una digestión con endonucleasas, comprobación del resultado de una PCR, etc.

La agarosa que se empleó fue de baja electroendosmosis (Pronadisa) y su concentración osciló entre el 0.7% y el 1.5%, dependiendo del tamaño de los fragmentos de ADN que se pretendiera separar. El tampón de carga utilizado consistió en una solución de azul de bromofenol (0.125%) y Ficoll 400 (12.5%).

Como marcador de peso molecular se utilizó la escalera *1kb DNA ladder RTU (Nippon Genetics Europe GmbH)*. Las muestras se mezclaron con 1/10 de volumen de tampón de carga. Para hacer visibles las bandas se añadió bromuro de etidio al gel de agarosa, a una concentración final de 0.5  $\mu$ g/mL, o la alternativa no carcinogénica al bromuro de etidio llamada *Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe GmbH)*, a la misma concentración. Los genes se iluminaron con un transiluminador de radiación ultravioleta (UV) y se fotografiaron digitalmente en *GelDoc* (BioRad).

<sup>11</sup>TAE: Tris 40 mM, EDTA 1 mM, pH ajustado a 7.7 con ácido acético.

### **3.5 Aislamiento de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa**

Generalmente, se utilizó el sistema comercial *MEGAquick-spin Total Fragment DNA Purification Kit*, suministrado por *iNtRON Biotechnology* y siguiendo las instrucciones del fabricante.

También se aislaron bandas de ADN mediante el procedimiento *gene-clean*. Para ello, se añadió al bloque de agarosa el equivalente a 2-3 volúmenes (unos 300  $\mu$ L) de NaI 6M y se calentó a 55°C hasta la fusión de la agarosa. Se añadieron 10  $\mu$ L de sílica 100 mg/mL (*Sigma-Aldrich*) y se mantuvo en hielo durante 5 minutos. Se centrifugó a máxima velocidad durante 30 segundos, se eliminó el sobrenadante y se lavó con 500  $\mu$ L de tampón de lavado<sup>12</sup>. El proceso de centrifugado y lavado se repitió dos veces más. Después, se centrifugó y se dejó secar el sedimento, el cual se acabó resuspendiendo en 5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>Odd. Se incubó durante 10

min a 55°C, se centrifugó durante 30 segundos a 13000 rpm, se recogió el sobrenadante y se repitió el paso de resuspensión, tras lo que se reunió el nuevo sobrenadante con el sobrenadante anterior.

<sup>12</sup>**Tampón de lavado:** Tris-HCl 20 mM pH 7.2, NaCl 200 mM, EDTA 2 mM pH 8 y etanol al 55%

### **3.6 Transformación de bacterias**

#### **3.6.1 Transformación de *E. coli* quimiocompetentes**

Se prepararon células quimiocompetentes mediante el método de cloruro de rubidio. Un cultivo saturado de la estirpe receptora de *E. coli* (DH5 $\alpha$ , BL21) se diluyó en proporción 1:100 en 100 mL de medio LB en un matraz de 250 mL y se incubó a 37°C con una agitación de 200 rpm, hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> aproximada de 0.5. El cultivo se transfirió rápidamente a hielo y se mantuvo en frío durante 5 minutos. Las bacterias se recogieron con una centrifugación a 6000 rpm a 4°C durante 5 minutos. El pellet se resuspendió en 30 mL de buffer TFB1<sup>13</sup> frío y se incubó en hielo durante 90 minutos. Las bacterias se recogieron por centrifugación (5 min, 6000 rpm, 4°C), se decantó el sobrenadante con cuidado y se resuspendieron las bacterias en 4 mL de TFB2<sup>14</sup> frío. Se prepararon alícuotas de 200  $\mu$ L en tubos de microcentrifuga estériles, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

Para la transformación, una alícuota de bacterias competentes descritas anteriormente se descongeló lentamente en hielo y se mezcló con el plásmido. Dicha mezcla se incubó en hielo durante 20 minutos y, a continuación, se sometió a choque térmico (42°C durante 90 segundos) y se añadieron 500  $\mu$ L de Psi-Broth<sup>15</sup>. La mezcla se incubó a 37°C con agitación durante 1h y se sembró en una placa de medio selectivo.

<sup>13</sup>**TFB1:** RbCl 100 mM, MnCl<sub>2</sub> 50 mM, acetato de potasio 30 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, glicerol 15%, pH 5.8.

<sup>14</sup>**TFB2:** MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 75 mM, glicerol 15%, ajustar pH a 6.8 con KOH.

<sup>15</sup>**Psi-Broth:** Medio LB, 4 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM KCl.

#### **3.6.2 Electroporación de bacterias**

Este método se empleó tanto para *E. coli* como para *S. enterica*. Se diluyó un cultivo saturado en LB, en proporción 1:100, y se cultivó a 37°C hasta que alcanzara una DO<sub>600nm</sub> de entre 0.6-0.8. En ese momento, el crecimiento se detuvo manteniendo el cultivo en hielo durante 5 minutos. 25 mL del cultivo se transfirieron a un tubo *Falcon* de 50 mL y se centrifugó 5 minutos a 4000 rpm y 4°C. Se retiró el sobrenadante y las bacterias se resuspendieron suavemente en 1 mL de H<sub>2</sub>O fría y estéril. Se rellenó el tubo con 24 mL más de H<sub>2</sub>O fría y estéril y las bacterias se centrifugaron en las mismas condiciones. Esta operación se repitió por segunda vez y finalmente, tras la última centrifugación, las bacterias se resuspendieron en un volumen de H<sub>2</sub>O fría y estéril que permitiera repartir 40  $\mu$ L por muestra.

La electroporación se realizó mezclando 1  $\mu$ L de ADN plasmídico con los 40  $\mu$ L de bacterias electrocompetentes, transfiriendo la mezcla a una cubeta de electroporación con una distancia entre los electrodos de 0.2 mm, previamente enfriada. La cubeta se sometió a una descarga

eléctrica en el electroporador (2.5 kV, 25  $\mu$ F y 200  $\Omega$ ). El electroporador utilizado fue un *Electrocell Manipulator 600*, fabricado por BTX. Tras la descarga eléctrica, se añadió 1 mL de LB a la cubeta y la mezcla se transfirió a un microtubo para incubarla durante 1 hora a 37°C en agitación. Tras la incubación, las bacterias se recogieron por centrifugación, se concentraron en 100  $\mu$ L. Se realizaron diluciones seriadas de este volumen y se sembraron en medio selectivo para obtener colonias aisladas de transformantes.

### **3.7 Transformación de levaduras**

#### **3.7.1 Transformación de levaduras en medio sólido a partir de biomasa**

Se preparó la mezcla de transformación mezclando 720  $\mu$ L de PEG3350 (preparado previamente al 50% en acetato de litio 0.1 M en tampón TE) junto con 180  $\mu$ L de acetato de litio 0.1 M en TE y 100  $\mu$ L de DTT.

Para cada transformación, se utilizan 100  $\mu$ L de la mezcla de transformación, los cuales se colocan en un microtubo con un poco de biomasa de la estirpe que se vaya a transformar y 1-2  $\mu$ g del ADN que corresponda. Se incubó la mezcla 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente 30 minutos a 45°C en un termobloque, con agitación puntual para mantener la homogeneidad de la mezcla. Tras estas dos incubaciones, se siembra en medio selectivo.

#### **3.7.2 Transformación de levaduras con genoteca en medio líquido**

Se utilizó la estirpe de *S. cerevisiae* L40 previamente transformada con el vector pIZ1628 (pLEX10-SlrP) y se transformó siguiendo el método del acetato de litio (Sherman et al., 1987) con algunas modificaciones.

Se partió de una colonia de la levadura L40/pLEX10-SlrP, la cual se resuspendió en 5 mL de DO-Trp y se juntó con otros 45 mL del mismo medio en un matraz estéril de 250 mL de capacidad. Esto constituye el preinóculo, que se incubó durante toda la noche a 30°C en agitación. Posteriormente se midió la  $DO_{600nm}$  y se diluyó en un total de 250 mL del mismo medio selectivo en un matraz estéril de 2 L de capacidad para que el cultivo quedara a  $DO_{600nm} = 0.2$ . Este cultivo diluido se incubó a 30°C en agitación unas 3-4 h hasta llegar a  $DO_{600nm}$  entre 0.4 y 0.6, lo que corresponde a una concentración de entre  $1 \times 10^7$ - $2 \times 10^7$  células/mL. Las levaduras se recogieron mediante centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos, se vertió el sobrenadante en el matraz del cultivo nuevamente y se pasó por una segunda centrifugación, para rescatar el máximo posible de levaduras que pudiesen quedar.

Se realizaron dos lavados, con 50 mL de H<sub>2</sub>O cada lavado, y se volvieron a recoger las levaduras mediante centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos, también aprovechando el sobrenadante para recoger el máximo posible de levaduras con una segunda centrifugación. A continuación, se realizó un lavado con 50 mL de acetato de litio 0.1 M en TE. Se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos y se resuspendió en 10 mL de acetato de litio 0.1 M en TE. Se incubó 1 hora a 30°C en agitación suave (50 rpm). Tras la incubación se añadieron 2 mL de acetato de litio 0.1 M en TE, 60  $\mu$ g de la genoteca y 20 mL de PEG3350 (preparado al 40% en acetato de litio 0.1 M en TE). La mezcla se incubó de nuevo 1 hora a 30°C en agitación suave

(50 rpm). Posteriormente se pasó a un baño a 42°C durante 30 minutos. En este paso del procedimiento es cuando el ADN de la genoteca entra en las levaduras.

Después de la incubación, se centrifuga 5 minutos a 3500 rpm (rescatando con el sobrenadante el máximo de levaduras del matraz en una segunda centrifugación). Se resuspende en 50 mL de medio SD-Trp, repitiendo dos veces más el proceso de centrifugación y lavado. Finalmente, se pasan las levaduras a un matraz de 2 L con 250 mL de medio selectivo SD-Leu-Trp (SD<sup>-2</sup>) y se deja durante toda la noche a 30°C en agitación. Pasado este tiempo se centrifugan las levaduras a 3500 rpm durante 5 minutos (recuperando levaduras en una segunda centrifugación con el sobrenadante) y se resuspende en 2 mL de SD<sup>-2</sup>. Se calculó el volumen total y se sembraron 200 µL en cada placa de 150 mm de diámetro, con medio selectivo SD-Trp-Leu-His (SD<sup>-3</sup>) con agar. Se reservaron 200 µL para realizar diluciones seriadas y sembrarlas en placas de 100 mm de diámetro con medio SD<sup>-2</sup> con agar para calcular la eficiencia de la transformación.

### **3.8 Transfección de células de mamíferos**

#### **3.8.1 Transfección de células HeLa**

Se utilizaron cultivos celulares subconfluentes, obtenidos en placas de 10 ó 15 cm de diámetro, de forma que se dispusiera de varios millones de células HeLa para realizar el procedimiento. Las células se despegaron de la placa con tripsina y se contaron en un hemocitómetro, se recogieron mediante centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos y se resuspendieron en medio de electroporación (DMEM suplementado con 15 mM de HEPES a pH 7.4) a una concentración de 5x10<sup>6</sup> células por cada 200 µL.

Para cada transfección, se prepararon 5 µg de ADN (purificado previamente mediante las columnas *PureYield™ Plasmid Midiprep System* de *Promega*) en 50 µL de H<sub>2</sub>O, con NaCl a una concentración de 200 mM. Esta mezcla se juntó con 200 µL de células HeLa resuspendidas, y se transfirió todo a una cubeta de electroporación, que para estas células debe tener una distancia entre placas de 4 mm. Las electroporaciones se realizaron en el electroporador *BTX Electrocell Manipulator 600 (Harvard Apparatus)*, sometiendo la cubeta a una descarga eléctrica con las siguientes condiciones: 950 µF, 720 Ω y 240 V. Tras la electroporación, se añadió 1 mL de medio de electroporación a las células para poder transferirlas a un tubo *Falcon* junto con otros 9 mL de medio de electroporación. Las células se centrifugaron 10 minutos a 1000 rpm y, tras descartar el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en 10 mL de medio DMEM fresco y se cultivaron en una placa de 10 cm de diámetro durante 24 horas, momento en que se alcanza la máxima expresión del ADN transfectado.

#### **3.8.2 Transfección de células HEK293T**

A diferencia de las células HeLa, las células HEK293T se transfectaron mediante lipofección, para lo cual se utilizó el polímero *Xfect™ Transfection Reagent (Clontech)*. También se utilizaron cultivos celulares subconfluentes ajustados a las recomendaciones del fabricante del polímero (entre un 50-70% de confluencia en el momento de la transfección). Otra diferencia

respecto a células HeLa es que estas transfecciones se llevaron a cabo en placas multipocillos de 6 pocillos o 24 pocillos.

Todo el procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones aportadas por el fabricante, obteniendo una óptima expresión del ADN transfectado en células HEK293T a las 48 horas.

### **3.9 Oligonucleótidos**

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de amplificación y secuenciación fueron sintetizados por *StabVida*, y se muestran en la Tabla M.5.

**Tabla M.5. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.**

<b>Oligonucleótido/uso</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>
<b>Construcción de pIZ2336</b>	
SseKIGFPCEcoRifw	ATCGGAATTCGATGATCCCACCATTAAATAGATATG
SseKIGFPCBamHlrev	ATCGGGATCCATTCCGCTACTGCACATGC
<b>Construcción de pIZ2352</b>	
ZBTB16pCSEcoRifw	ATCGGAATTCGAGCAGCACAGGAAGCTGCAC
ZBTB16pCSXbalrev	ATCGTCTAGATCACACATAGCACAGGTAGAGG
<b>Construcción de pIZ3405</b>	
SseK2ecofw	GATCGAATTCATGGCACGTTTTAATGCCGC
SseK2salrv	ACGTGTCGACTTACCTCCAAGAACTGGCAG
<b>Construcción de pIZ3406</b>	
SseK3ecofw	ATGCGAATTCATGTTTTCTCGAGTCAGAGG
SseK3salrv	ATGCGTCGACTTATCTCCAGGAGCTGATAG
<b>Construcción de pIZ3423</b>	
TBCBEcoRifw	ATCGGAATTCGAGGTGACGGGGGTGTCGGC
TBCBXbalrev	ATCGTCTAGATCATATCTCGTCCAACCCG
<b>Construcción de pIZ3509</b>	
TBCBEcoRifw	ATCGGAATTCGAGGTGACGGGGGTGTCGGC
TBCBSTOPXholrev	ATCGCTCGAGGTCATATCTCGTCCAACCCG
<b>Construcción de pIZ3510</b>	
TBCBEcoRifw	ATCGGAATTCGAGGTGACGGGGGTGTCGGC
TBCB125STOPXholrev	ATCGCTCGAGTCACAGGAAAGAGCGGACCGTGTC
<b>Construcción de pIZ3511</b>	
TBCB126EcoRifw	ATCGGAATTCAAGCGCAGCAAGCTCGGCCG
TBCBSTOPXholrev	ATCGCTCGAGGTCATATCTCGTCCAACCCG
<b>Construcción de pIZ3521</b>	
Ssek3pEGFPC1EcoriFW	ATCGGAATTCTATGTTTTCTCGAGTCAGAGG
SseK3salrv	ATGCGTCGACTTATCTCCAGGAGCTGATAG
<b>Identificación de los candidatos LSM2 del escrutinio de doble híbrido</b>	
LSM2fw	TCAAGTCCCTTGTGGGCAAG
LSM2rev	TCACTGTTTCTGCTGCAGGG
<b>Identificación de los candidatos PPP1R7 del escrutinio de doble híbrido</b>	
PPP1R7fw	CTAAACTCAGAACCTGGATG
PPP1R7rev	TCAGAACCTGACGAACGTGG

<b>Identificación de los candidatos RABIF del escrutinio de doble híbrido</b>	
RABIFfw	CGTTGCGGCTCCCGGGTGCTG
RABIFrev	TTACTCATGGGAAACTCGTTC
<b>Identificación de los candidatos SNRPD2 del escrutinio de doble híbrido</b>	
SNRPD2fw	AGGAGCTGCAGAAGCGAGAG
SNRPD2rev	CTACTTGCCGGCGATGAGCG
<b>Identificación de los candidatos TRX del escrutinio de doble híbrido</b>	
Tio5.	GTCAGAATTCATGGTGAAGCAGATCGAGAG
TrxG91Erev	CAAGCTTTTCCTTATTGGCTTCAGAAAATTCACCCACCTTTTG
<b>Mutagénesis de SseK1</b>	
SseK1DXD223AAAw	GGTGTATATATCTTGCTGCTGCTATGATTATCACGG
SseK1DXD223AAAre	CCGTGATAATCATAGCAGCAGCAAGATATATACACC
<b>Mutagénesis de SseK3</b>	
SseK3DXD226AAAw	GGCTGCATATATCTTGCTGCTGCTATGTTACTTACAGG
SseK3DXD226AAAre	CCTGTAAGTAACATAGCAGCAGCAAGATATATGCAGCC
<b>Mutagénesis de TBCB</b>	
TBCBR196Aw	GGCTACTGGATTGGTGTGCGCCTATGATGAGCCACTGGG
TBCBR196Are	CCCAGTGGCTCATCATAGGCGACACCAATCCAGTAGCC
<b>Secuenciación de los candidatos del escrutinio de doble híbrido</b>	
Gal4AD	TACCACTACAATGGATG

### **3.10 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Para las reacciones de amplificación por PCR, se utilizó un termociclador *T100™ Thermal Cycler* (BioRad). Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 50 µL, una mezcla en la que se incluían 1 ng de ADN, desoxinucleótidos (dNTPs) a una concentración final de 300 µM cada uno, cebadores 0.3 µM, MgCl<sub>2</sub> a una concentración final de 1.5 mM y 1 U de polimerasa. El volumen utilizado de cada compuesto se refleja en la Tabla M.6.

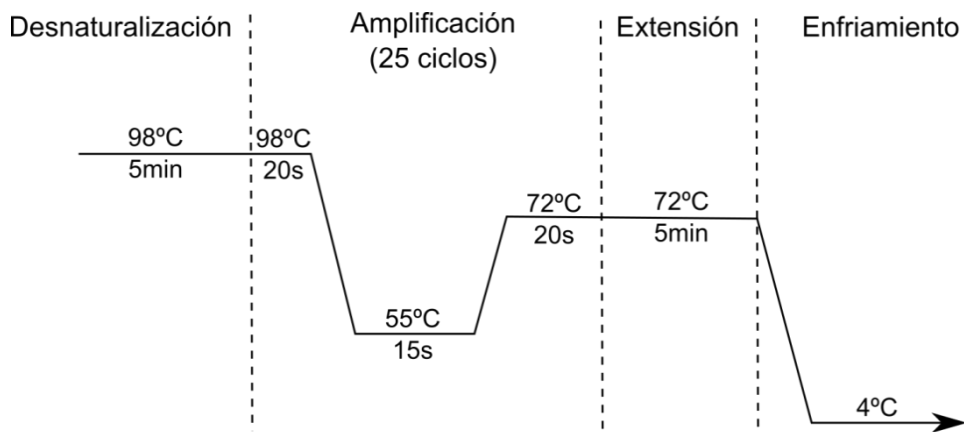
**Tabla M.6. Componentes de la reacción PCR y volúmenes necesarios para una reacción de 50 µL.**

<b>Compuesto</b>	<b>Volumen</b>
<b>Tampón 5X</b>	10 µL
<b>DMSO</b>	1.5 µL
<b>dNTPs 10 µM</b>	1.25 µL
<b>Oligonucleótido 5'</b>	2 µL
<b>Oligonucleótido 3'</b>	2 µL
<b>ADN molde</b>	1 µL
<b>Polimerasa</b>	1 µL
<b>H<sub>2</sub>O</b>	31'25 µL

El programa térmico incluía los siguientes pasos: (I) desnaturalización inicial, 5 min a 98°C; (II) 25 ciclos de desnaturalización (98°C, 20 s), alineamiento (55°C, 15 s) y extensión (72°C, 30 s/kb); e (III) incubación final a 72°C durante 5 minutos para completar la extensión. Se muestra en la Figura M.1 de forma más gráfica el programa utilizado en el termociclador. La polimerasa empleada en estas reacciones fue la *KAPA HiFi DNA polymerase*, suministrada por *Kapa Biosystems*.



**Figura M.1. Etapas del programa de reacción PCR.**



Para la confirmación de algunos clones, se realizaron reacciones de PCR a partir de colonias, y en este caso se utilizó la polimerasa *MyTaq<sup>TM</sup> Red DNA polymerase*, suministrada por *Bioline*. Para utilizar esta enzima, se preparó una mezcla con 5  $\mu$ L de tampón de reacción proporcionado por la casa comercial (que contenía dNTPs 5 mM y  $MgCl_2$  15 mM), cebadores 0.2  $\mu$ M y 1 U de *Taq* polimerasa por reacción, en un volumen final de 25  $\mu$ L. En esta mezcla se resuspendió poca cantidad de biomasa procedente de una colonia, y servía como molde de ADN. El programa térmico incluía los siguientes pasos: (I) desnaturalización inicial, 3 min a 95°C; (II) 30 ciclos de desnaturalización (95°C, 15 s), alineamiento (55°C, 15s) y extensión (72°C, 30 s/kb); y (III) una incubación final a 72°C durante 5 min para completar la extensión.

Antes de utilizar los productos de PCR para alguna técnica de Biología Molecular, se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa para limpiarlos de proteína, oligonucleótidos y dNTPs, y posteriormente se purificaron las bandas mediante el sistema comercial *MEGAquick-spin dual agarose gels and purification kit*, suministrado por *iNtRON Biotechnology*.

### **3.11 Mutagénesis puntual**

El protocolo se realizó siguiendo las instrucciones del kit *QuickChange II site-directed mutagenesis kit*, de *Stratagene*.

Se diseñaron las parejas de oligonucleótidos SseK1DXD223AAAw y SseK1DXD223AAAr; SseK3DXD226AAAw y SseK3DXD226AAAr; TBCBR196Aw y TBCBR196Ar (Tabla M.5), con el objetivo de realizar mutaciones puntuales en los dominios catalíticos de SseK1 y SseK3, y una mutación puntual en el aminoácido R196 de TBCB. Estos oligonucleótidos contenían los cambios en los nucleótidos que se querían realizar en los genes originales, y se utilizaron como cebadores para amplificar por PCR la nueva secuencia mutada. Para construir el mutante puntual en *TBCB* se utilizó como molde el plásmido pIZ3509, mientras que para construir las mutaciones en *sseK1* y *sseK3* se usaron los plásmidos pIZ2336 y pIZ3521, respectivamente (Tabla M.4).

El programa térmico de la reacción de PCR en este caso era ligeramente diferente, ya que el objetivo fue amplificar el plásmido entero a partir de los cebadores, por tanto los pasos fueron los siguientes: (I) desnaturalización inicial, 30 s a 95°C; (II) 12 ciclos de desnaturalización (95°C, 30 s), alineamiento (42°C, 1 minuto) y extensión (68°C, 5 minutos); y (III) incubación final, 7 minutos a 72°C. El resultado obtenido de la reacción se trató con 1 µL de la enzima de restricción DpnI (10 U/µL) durante 1 hora a 37°C. Esta enzima tiene como diana la secuencia GATC si el ADN se encuentra metilado y hemimetilado, hecho que sucede en los plásmidos procedentes de bacterias, pero no en los plásmidos recién sintetizados en la reacción de PCR. Por tanto, se eliminan los restos del ADN molde y se mantienen intactos los plásmidos nuevos.

Posteriormente, se utilizó 1 µL de ADN tratado con DpnI para transformar la estirpe de *E. coli* DH5α, y se seleccionaron los transformantes en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente. La introducción de las mutaciones puntuales se confirmó mediante secuenciación.

### **3.12 Secuenciación**

Los plásmidos purificados por preparaciones y los fragmentos de ADN obtenidos por reacciones PCR se secuenciaron en el servicio de secuenciación de ADN de *StabVida*.

### **3.13 Análisis de secuencias**

Los análisis bioinformáticos de las secuencias de ADN se realizaron utilizando los algoritmos de biología molecular del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), en la dirección [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

## **4. MANIPULACIÓN Y TRANSFERENCIA DE ARN**

### **4.1 Extracción de ARN eucariota con TRIzol®**

Este método es una modificación del protocolo de extracción de ARN con *TRIzol® Reagent* suministrado por *Invitrogen Life Technology*.

Para la obtención del ARN total de células HeLa, se realizaron tres extracciones diferentes para cada una de las condiciones que se estudió. Se partió de cultivos confluentes que se encontraban en placas de 6 pocillos. Se retiró el medio y se añadió directamente 1 mL de TRIzol®, sin ningún paso de lavado para evitar cualquier posible degradación del ARN. El contenido de cada pocillo se homogeneizó para lisar por completo las células que se encontraban dentro. La muestra homogeneizada se recogió y se almacenó a -80°C (donde puede permanecer al menos un mes).

Tras la descongelación, la muestra se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó en frío a 13000 rpm durante 10 minutos. Se recogieron los sobrenadantes en tubos limpios (de modo que se descartaba el ADN genómico) junto con 200  $\mu$ L de cloroformo. Esta mezcla se agitó en el vórtex durante 15 segundos y se centrifugó en frío a 13000 rpm durante 15 minutos. Se recogió de nuevo el sobrenadante (sin llegar a coger la interfase), se pasó a tubos limpios y se le añadió el mismo volumen (en torno a 500  $\mu$ L) de isopropanol. La mezcla se homogeneizó y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después, se centrifugó a 13000 rpm en frío durante 10 minutos, y en este momento se descartó el sobrenadante, mientras que el precipitado se lavó con etanol frío al 70%. Se centrifugó en frío una vez más a 13000 rpm durante 5 minutos, eliminando el sobrenadante. Se dejaron secar los precipitados y, cuando se consiguió, se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta que se usaron, momento en que se resuspendieron en 30  $\mu$ L de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de RNAsas. En aquellos casos en que quedó una suspensión gelatinosa, la muestra se incubó a  $65^{\circ}\text{C}$  para obtener una mezcla menos densa y homogénea que se pudiera recoger fácilmente con la micropipeta.

#### **4.2 Limpieza del ARN mediante kit comercial**

Por recomendación del servicio que realizó el análisis de transcriptómica con el *microarray*, tras la extracción del ARN se añadió un paso de limpieza mediante el kit comercial *RNeasy MinElute Cleanup Kit*, suministrado por *Qiagen*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **4.3 Análisis de la expresión génica por microarray**

Las muestras de expresión génica se obtuvieron en las siguientes condiciones: (I) células HeLa no infectadas; (II) células HeLa infectadas durante 8 horas por *S. Typhimurium* 14028; y (III) células HeLa infectadas durante 8 horas por *S. Typhimurium* SV5031 ( $\Delta$ *slrP*). Para su análisis se utilizó el chip *GeneChip Human Gene 1.0 ST array* (Affymetrix).

Para llevar a cabo este análisis, se extrajo ARN de tres cultivos independientes para cada una de las condiciones a las que se sometieron las células HeLa. La cuantificación e integridad de las muestras de ARN aisladas se determinó con el aparato *ND-1000 Spectrophotometer NanoDrop®* (*NanoDrop Technologies, Inc.*). Una vez verificada la calidad de las muestras de ARN total, a partir de 100 ng de cada muestra se sintetizó el ADNc mediante una reacción de retrotranscripción. Después, el ADNc se amplificó, se purificó y se marcó con biotina.

Posteriormente, se realizó la hibridación de los microarrays siguiendo las instrucciones del fabricante, y se leyeron los resultados en el *Scanner 3000 7G* (Affymetrix). El análisis de imágenes, la cuantificación de datos de fluorescencia y el control de calidad del proceso se realizaron con el software de *Affymetrix*.

Todos los procedimientos y análisis preliminares, en los que se incluyen el procesado de datos de fluorescencia, normalización de los datos utilizando algoritmos RMA (*Robust Multi-array Average*) y anotaciones, se llevaron a cabo en la Unidad de Genómica del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER). Las variaciones de expresión (en inglés

*fold change*, FC) se calcularon sobre la base de diferentes comparaciones, como se explica en la sección de Resultados.

La significación estadística (valor p) se calculó mediante el análisis estadístico realizado por LIMMA (*Linear Models for Microarray Analysis*), utilizando el paquete oneChannelGUI, basándose en los resultados de los tres arrays por condición. Los genes cuya variación de expresión obtuvo un valor p mayor de 0.05 se eliminaron del análisis.

#### **4.4 Análisis de ontología génica**

El análisis de ontología génica (GO, *Gene Ontology*) se basa en la descripción de los atributos funcionales del producto de un gen según tres categorías: función molecular, proceso biológico y componente celular (Carbon et al., 2019). Los datos para los genes de interés se obtuvieron de la base de datos Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), mientras que de las herramientas GeneMANIA (Warde-Farley et al., 2010) y STRING (Szklarczyk et al., 2019) se obtuvo información sobre las conexiones entre los genes con expresión diferencial.

## **5. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS**

### **5.1 Preparación de extractos proteicos**

#### **5.1.1 Extractos bacterianos para análisis en gel de poliacrilamida**

Para la preparación de lisados totales se cultivaron las bacterias en las condiciones adecuadas de crecimiento. Una vez alcanzado el crecimiento, se tomó el volumen de cultivo deseado y se recolectaron las bacterias mediante centrifugación. Se resuspendieron en tampón de *Laemmli*<sup>16</sup> y se calentó a 95°C durante 5 minutos. Se centrifugó la muestra a 13000 rpm unos segundos y se cargó el sobrenadante en el gel de poliacrilamida.

<sup>16</sup>**Tampón de *Laemmli*:** SDS 2%, glicerol 10% (v/v), Tris-HCl 50 mM, β-mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0.0125%.

#### **5.1.2 Extractos de cultivos celulares humanos para análisis en gel de poliacrilamida**

Se recogieron las células por tripsinización y se contaron utilizando una cámara de *Neubauer*. Se centrifugaron durante 10 minutos a 1000 rpm a temperatura ambiente, y se lavaron dos veces con PBS. El precipitado de células se incubó en tampón de lisis NP40<sup>17</sup> con inhibidores de proteasas<sup>18</sup>, durante 20 minutos en hielo. Tras la lisis, el extracto se centrifugó durante 15 minutos a 13000 rpm en frío. El sobrenadante se recogió y se almacenó en un tubo nuevo a -80°C. Para los análisis en gel de poliacrilamida, un pequeño volumen de extracto se mezcló con tampón de *Laemmli*, se incubó 5 minutos a 95°C y se cargó en el gel.

<sup>17</sup>**Tampón de lisis NP40:** Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, glicerol 10% y NP40 1%

<sup>18</sup>**Inhibidores de proteasas:** 10 µL/mL de PMSF 0.1 M y 5 µL/mL de un cóctel de inhibidores de proteasas (*Sigma*)

## **5.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida**

En esta técnica, las proteínas se separan por su peso molecular mediante un sistema denominado SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), descrito originalmente en (Laemmli, 1970). Se utilizó el sistema vertical *Mini Protean Tetra Cell* (*Bio-Rad*). Las proteínas se concentraron en un gel de *stacking*<sup>19</sup> de 1 cm de longitud, y después se separaron en un gel de separación<sup>20</sup> de 5 cm de longitud. La concentración de acrilamida fue del 4% para el gel de *stacking*, mientras que para el gel de separación fue del 10 o 12%, en función del tamaño de las proteínas que se quisieran separar. La electroforesis se realizó en tampón de migración<sup>21</sup> aplicando una tensión de 175 V durante unos 45-60 min.

<sup>19</sup>**Gel de *stacking*:** Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 0.1% (p/v), acrilamida:bisacrilamida 4% (*Solu Gel 29:1 Ultra Pura*, Pronadisa), TEMED 0.1% (v/v) y persulfato amónico 0.05% (p/v).

<sup>20</sup>**Gel de separación:** Tris-HCl 375 mM pH 8.8, SDS 0.1% (p/v), acrilamida:bisacrilamida 10-12% (*Solu Gel 29:1 Ultra Pura*, Pronadisa), TEMED 0.05% (v/v) y persulfato amónico 0.05% (p/v).

<sup>21</sup>**Tampón de migración (10X):** Glicina 144.1 g/L, SDS 10 g/L, Trizma base 30.3 g/L. Ajustar pH a 8.8.

## **5.3 Marcadores de peso molecular**

Como patrones de peso molecular se utilizaron dos tipos de marcadores comerciales: *SDS-PAGE Molecular Weight Standards Low Range* (*Bio-Rad*) y *Precision Plus Protein Standards Dual Color* (*Bio-Rad*).

## **5.4 Tinción de geles con azul de Coomassie**

Para teñir un gel que se ha sometido a SDS-PAGE, se utilizó el colorante *Coomassie Brilliant Blue R-250* (*Sigma-Aldrich*). La tinción se realizó bañando el gel en solución de tinción<sup>22</sup> durante 30 minutos en agitación muy suave. Pasado este tiempo, se retiró la solución, se eliminaron los restos con H<sub>2</sub>Odd y se sumergió el gel en solución de destinción<sup>23</sup>. El gel se mantuvo sumergido en solución de destinción hasta que las bandas de proteínas se visualizaron de forma adecuada.

<sup>22</sup>**Solución de tinción:** *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0.25% (p/v), ácido acético 10% y etanol 10%.

<sup>23</sup>**Solución de destinción:** ácido acético 10% y etanol 40%.

## **5.5 Inmunodetección de proteínas mediante Western Blot**

### **5.5.1 Transferencia a la membrana de nitrocelulosa**

Las proteínas que se separaron mediante SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (*Amersham Hybond-ECL, GE Healthcare*) utilizando el sistema de transferencia semiseca *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad)*. El gel se equilibró durante 10 min en tampón de transferencia<sup>24</sup>. La membrana de nitrocelulosa y 6 porciones de papel *Whatmann 3MM* fueron impregnados en el mismo tampón. Se montó el *sandwich* de transferencia poniendo en contacto el gel con la membrana de nitrocelulosa y rodeando el conjunto con 3 papeles *Whatmann 3MM* tanto por encima como por debajo. Se introdujo en el sistema de transferencia y se programó el aparato a 25 V y 1 A durante 30 minutos para transferir las proteínas.

<sup>24</sup>**Tampón de transferencia (10X):** Trizma base 58.2 g/L y glicina 29.3 g/L. El tampón de transferencia a 1X contiene un 20% de etanol (v/v).

### **5.5.2 Tinción con Rojo Ponceau**

Después de la transferencia, la membrana se lavó dos veces con H<sub>2</sub>O y se tiñó con una solución de Rojo Ponceau<sup>25</sup> durante 5 minutos. Después, se lavó de nuevo con H<sub>2</sub>O hasta la aparición de bandas. Esta tinción permitió tener un control de carga de cada una de las muestras.

<sup>25</sup>**Solución Rojo Ponceau:** 0.5% (p/v) del colorante *Ponceau S* en ácido acético al 1%

### **5.5.3 Bloqueo de la membrana de nitrocelulosa**

Previamente a la incubación con anticuerpos, la membrana de nitrocelulosa se incubó con tampón de bloqueo<sup>26</sup> durante al menos 1 hora en agitación suave a temperatura ambiente.

<sup>26</sup>**Tampón de bloqueo:** *Odyssey® Blocking Buffer (TBS)* (Li-COR), o leche desnatada en polvo al 5% (p/v) en TBS-Tween 0.1%. La elección de uno u otro dependió de si el revelado de la técnica sería mediante quimioluminiscencia o fluorescencia.

### **5.5.4 Incubación con anticuerpo primario**

Tras el bloqueo de la membrana, se añadió el anticuerpo primario (previamente preparado a una dilución correspondiente en tampón de bloqueo<sup>27</sup>). La incubación con el anticuerpo primario se producía en agitación suave y se mantenía durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados en esta tesis están listados en la Tabla M.7.

<sup>27</sup>**Tampón de bloqueo (2):** Para la incubación con anticuerpo primario, el tampón *Odyssey® Blocking Buffer (TBS)* (Li-COR) debía llevar TBS-Tween al 0.2%.

### 5.5.5 Incubación con el anticuerpo secundario

Tras la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron tres veces con TBS-Tween<sup>28</sup> durante 10 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario diluido en TBS-Tween durante 1 hora con agitación suave. Los anticuerpos secundarios estaban conjugados con la enzima peroxidasa (HRP) o con un marcaje fluorescente. En este último caso, la incubación se realizó en oscuridad para proteger los fluoróforos. Después de este paso, se lavó la membrana de nuevo seis veces con TBS-Tween durante 5 minutos.

<sup>28</sup>TBS-Tween (10X): Trizma base 24.2 g/L, NaCl 80 g/L y Tween-20 10 mL/L. Ajustar pH a 7.6

Tabla M.7. Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas. WB: western blot; IP: inmunoprecipitación; IF: inmunofluorescencia.

Anticuerpo	Tipo	Origen	Casa comercial	Uso/dilución
<b>Anticuerpos primarios</b>				
<b>Anti-FLAG M2</b>	Monoclonal	Ratón	<i>Sigma-Aldrich</i>	IP 1:100 WB 1:10000
<b>Anti-HA.11</b>	Monoclonal	Ratón	<i>Enzo</i>	IP 1:100 WB 1:10000
<b>Anti-GST</b>	Monoclonal	Ratón	<i>Sigma-Aldrich</i>	WB 1:10000
<b>Anti-HA-peroxidasa (clon 3F10)</b>	Monoclonal	Rata	<i>Roche</i>	WB 1:1000
<b>Anti-acetil-<math>\alpha</math>-tubulina</b>	Monoclonal	Conejo	<i>CST</i>	IF 1:800
<b>Anti-ArgGlcNAc</b>	Monoclonal	Conejo	<i>Abcam</i>	IP 1:100 WB 1:10000
<b>Anticuerpos secundarios</b>				
<b>IRDye<sup>®</sup> 800 CW anti-ratón</b>	Policlonal	Cabra	<i>Li-COR</i>	WB 1:15000
<b>IRDye<sup>®</sup> 680 DR anti-conejo</b>	Policlonal	Cabra	<i>Li-COR</i>	WB 1:15000
<b>Alexa Fluor Plus 594 anti-conejo</b>	Policlonal	Cabra	<i>Thermo Fisher Scientific</i>	IF 1:1000

### 5.5.6 Detección de la señal

La señal de inmunofluorescencia se detectó utilizando el sistema *Odyssey<sup>®</sup> Fc Imaging System* (Li-COR). Para detectar la señal de quimioluminiscencia, se aplicó previamente sobre la membrana el compuesto *SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce Biotechnology, Inc.), un sustrato sensible para la reacción llevada cabo por la peroxidasa.

Las imágenes se recogieron y se procesaron con el programa *Li-COR Image Studio Software*.

## 5.6 Purificación de proteínas

Se utilizaron dos sistemas diferentes: cromatografía de afinidad e inmunoprecipitación.

### 5.6.1 Purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad

Para esta forma de purificación de proteínas, se utilizó el sistema de la glutatión-S-transferasa (GST) o el sistema de las 6 histidinas (6His). En ambos casos, una proteína de fusión (con GST o con 6His) es purificada por afinidad con una matriz de agarosa (que contiene glutatión o iones de níquel, según el método correspondiente).

Para la expresión de proteínas en fusión con GST, se partió de un cultivo saturado de *E. coli* BL21 (DE3) o de *S. Typhimurium* SV7071 (que expresa la fusión Ssek1-3XFLAG) que contenía el vector pGEX-4T-1 o sus derivados. Para la expresión de proteínas bajo la etiqueta 6His, se utilizó un cultivo saturado de *E. coli* XL1-Blue, que lleva el represor del promotor desde el que se expresa la proteína de fusión en el vector pQE30 y sus derivados. Los cultivos se diluyeron en proporción 1:100 de LB suplementado con Amp, y se incubó a 37°C durante 1 hora. Entonces, se indujo la expresión de las proteínas de fusión añadiendo al cultivo isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración 1 mM, y se incubó durante 3 horas a 30°C o 37°C, según el sistema y la proteína a inducir.

Tras la inducción, se recogieron las bacterias por centrifugación en frío a 10000 rpm durante 10 minutos y se resuspendieron en tampón de lisis suplementado con inhibidores de proteasas, o en un tampón de lisis específico para las proteínas en fusión con 6His<sup>29</sup>. Después, se lisaron las bacterias mediante sonicación (50% de amplitud, 5 minutos, en hielo) y se separaron las fracciones soluble (sobrenadante) e insoluble (precipitado) mediante centrifugación en frío a 10000 rpm durante 30 minutos. 1 mL de fracción soluble se incubó con 100 μL de la matriz de agarosa con glutatión (*glutathione agarose beads*, de *Sigma-Aldrich*), o matriz de agarosa con iones de níquel (*Ni-NTA agarose beads*, de *Qiagen*) previamente equilibrada con tampón de lisis. Tras la incubación, la matriz se lavó 5 veces con tampón NP40 (proteínas con fusión a GST) o con tampón de lavado<sup>30</sup> (proteínas con fusión a 6His), dejando la matriz después de los lavados en un volumen de 100 μL del mismo tampón. Se utilizaron 5 μL para detectar la presencia de proteínas en gel de poliacrilamida mediante SDS-PAGE y tinción con azul de *Coomassie*.

Cuando fue necesario, se eluyeron las proteínas purificadas de la matriz de agarosa mediante la incubación durante 2 horas en un agitador orbital a 4°C con tampón de elución, diferente en el caso de las proteínas en fusión con GST<sup>31</sup> o las proteínas en fusión con 6His<sup>32</sup>. Finalmente, las proteínas eluidas se separaron de la matriz mediante centrifugación.

<sup>29</sup>**Tampón de lisis de proteínas 6His:** NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM. Ajustar pH a 8 con NaOH.

<sup>30</sup>**Tampón de lavado:** NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM. Ajustar pH a 8 con NaOH.

<sup>31</sup>**Tampón de elución para proteínas de fusión a GST:** glutatión reducido 10 mM en Tris-HCl a pH 8.

<sup>32</sup>**Tampón de elución para proteínas de fusión a 6His:** NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM. Ajustar a pH 8 con NaOH.



### 5.6.2 Inmunoprecipitación de proteínas

En esta técnica, se utilizan anticuerpos específicos contra una etiqueta o una modificación para capturar una proteína de interés a partir de un extracto de células de mamífero. Los extractos de células HeLa o HEK293T se prepararon tal y como se ha descrito en el apartado 5.1.2 de esta sección. Los extractos se incubaron durante dos horas con el anticuerpo correspondiente en proporción 1:100, en un agitador orbital a 4°C durante 2 horas, para inmunoprecipitar la proteína de interés. Posteriormente, los extractos se incuban con proteína A/G unida a agarosa, que sirve para capturar los anticuerpos. La incubación con proteína A/G se realiza durante una noche, también en el agitador orbital a 4°C. Finalmente, la matriz se somete a 5 lavados con tampón de lisis NP40. Para verificar si efectivamente se purificó la proteína de interés se realizaron ensayos de inmunodetección mediante *western blot* con los anticuerpos correspondientes.

### 5.7 Cuantificación de proteínas

La concentración total de proteína en los extractos se determinó utilizando el reactivo *Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad)*, siguiendo las instrucciones del fabricante. El protocolo está basado en el método de Bradford (Bradford, 1976). La concentración de proteínas purificadas se calculó cargando las proteínas de interés en un gel de poliacrilamida, y realizando SDS-PAGE y tinción con azul de *Coomassie*. La cantidad de proteína de las muestras se calculó extrapolando a partir de los valores de absorbancia de una curva de calibrado elaborada con albúmina de suero bovino (BSA, de *New England Biolabs*). La cuantificación se realizó con el sistema *Molecular Imager Gel Doc™ XR+* con el programa *Image Lab™ Software (Bio-Rad)*.

## **6. ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA**

### 6.1 Sistema del doble híbrido en levaduras

Este sistema se ha utilizado para detectar interacciones en la levadura *S. cerevisiae*. En este trabajo, se usó con la finalidad de encontrar proteínas humanas capaces de interactuar con el efector de *Salmonella* SlrP. Para ello, se introdujo el plásmido pIZ1628 en la estirpe L40. Este plásmido es un derivado del vector pLEX10, y expresa SlrP en fusión con el dominio de unión al ADN del factor bacteriano *lexA*.

Esta estirpe se transformó con la genoteca de ADNc de células humanas Jurkat, construida en el vector pGAD1318, de forma que genera proteínas en fusión con el dominio de activación de la transcripción del factor Gal4 de transcripción en levaduras. La transformación se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3 de Materiales y Métodos de esta tesis.

Si se produce una interacción entre el efector de *Salmonella* y la proteína codificada en la genoteca, los dominios a los que se encuentran fusionados se acercan y se reconstituye un factor de transcripción funcional que permite la expresión de genes marcadores, entre ellos *his3*. Al finalizar la transformación, se siembran las levaduras en un medio selectivo sin histidina, en los que sólo crecen aquellos transformantes en los que se haya producido interacción entre SlrP y proteína de la genoteca.

## **6.2 Copurificación por cromatografía de afinidad**

Se utilizó el sistema de purificación de proteínas de fusión a GST por cromatografía de afinidad, descrito en el apartado 5.6.1, y el sistema de etiquetado de proteínas con el epitopo 3xFLAG (Uzzau et al., 2001), para realizar un ensayo de copurificación *in vitro*. Se expresaron proteínas de fusión a GST en la estirpe SV7071 (estirpe 14028 de *S. Typhimurium*, que expresa la fusión SseK1-3xFLAG), y se purificaron mediante cromatografía de afinidad. Tras varios lavados, se analizó si la fusión SseK1-3xFLAG se copurificó junto con ellas mediante *western blot*, utilizando anticuerpos monoclonales anti-FLAG.

Una variante de este sistema consiste en purificar las proteínas de fusión a GST por separado, a partir de la estirpe BL21. De forma independiente, se prepara un extracto de bacterias de la estirpe SV7071 en tampón de lisis NP40. Las proteínas purificadas se mantienen inmovilizadas en la matriz de agarosa con glutatión, y entonces se incuban con el extracto. Tras la incubación, se realizan varios lavados y se analiza mediante *western blot* si se ha producido interacción con la proteína en fusión a GST.

Se incluyó un control negativo que consiste en usar la proteína GST sola para verificar que cuando se produce interacción no tiene lugar directamente con ésta y sí con la proteína de interés.

## **6.3 Coinmunoprecipitación**

En este tipo de experimentos, se ha estudiado la interacción de dos proteínas *in vivo* para confirmar las interacciones detectadas en el escrutinio con la genoteca de ADNc humano. También se estudió si SseK1 utilizaba alguna de las proteínas humanas como sustrato de su actividad catalítica.

### **6.3.1 Coinmunoprecipitación de SseK1 y TBCB/ZBTB16**

Mediante este experimento, se estudió la interacción entre el efector de *S. enterica* SseK1 y las proteínas humanas TBCB y ZBTB16. Se cotransfectaron células HeLa con los plásmidos pIZ2047, pIZ2352 y pIZ3423, que expresaban las fusiones SseK1-3xFLAG, 3xHA-ZBTB16 y 3xHA-TBCB, respectivamente. En el pico de expresión de las proteínas transfectadas (24 horas desde la electroporación de las células HeLa), se hicieron lisados con tampón de lisis NP40. Los lisados fueron sometidos al protocolo de inmunoprecipitación (apartado 5.6.2 de Materiales y

métodos) con anticuerpo anti-FLAG en proporción 1:100. Una vez finalizado el protocolo de inmunoprecipitación, se analiza mediante SDS-PAGE si por su interacción, junto con el efector de *Salmonella* que se ha precipitado, se encuentran presentes (o coimmunoprecipitan) las proteínas humanas, mediante la utilización de anticuerpos anti-HA.

### 6.3.2 Coimmunoprecipitación de TBCB modificada por SseK1

La base de esta coimmunoprecipitación es la misma que en el caso anterior: mismo tipo celular utilizado (células HeLa) y mismas cotransfecciones (pIZ2047 y pIZ3423), y con las que también se elaboran lisados con tampón de lisis NP40 en el momento de máxima expresión de las transfecciones a las 24 horas. Sin embargo, a la hora de realizar la inmunoprecipitación, en este caso el anticuerpo utilizado en el procedimiento es el anti-ArgGlcNAc, que detecta residuos de arginina modificados con N-acetilglucosamina, en proporción 1:100. Una vez finalizado el protocolo de inmunoprecipitación, se analiza mediante SDS-PAGE si, de entre todas las proteínas que son sustratos de la actividad catalítica de SseK1, se encuentra presente (o coimmunoprecipita) la proteína humana TBCB utilizando anticuerpos anti-HA.

## 7. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

### 7.1 Ensayo de actividad $\beta$ -galactosidasa en levaduras

Los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa se realizaron con el fin de confirmar posibles candidatos en el escrutinio de doble híbrido de SlrP, siguiendo el método descrito previamente por (Breedon and Nasmyth, 1985).

Se hicieron parches de las levaduras en medio selectivo SD<sup>-2</sup>, incubándose las diferentes estirpes a 30°C hasta el día siguiente. Se realizaron réplicas con un terciopelo en un filtro Whatmann 40 sobre el mismo medio selectivo SD<sup>-2</sup>. Tras otra incubación a 30°C durante 24 horas que permitieran crecer a las réplicas, se sumergió el filtro con levaduras en nitrógeno líquido durante 15-30 segundos, de modo que se permeabilizaron las levaduras, y se depositó en papel Whatmann 3, bañado en solución de reacción<sup>33</sup>. Se incubó la reacción a 37°C entre 2 y 8 horas, hasta que se observó coloración en aquellos parches utilizados como control positivo. Como control positivo se ensayó la interacción entre SlrP y Trx, previamente descrita en (Bernal-Bayard and Ramos-Morales, 2009), mediante los plásmidos pIZ1628 y pIZ1668.

<sup>33</sup>**Solución de reacción:** 3 mL de tampón Z, 8.1  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol y 15  $\mu$ L de X-Gal 4% (v/v).

### 7.2 Ensayo de actividad transferasa de N-acetilglucosamina *in vitro*

Estos ensayos se realizaron para determinar la actividad transferasa de N-acetilglucosamina de los efectores de la familia SseK de *S. Typhimurium* sobre sustratos específicos.

Para estos ensayos, todas las proteínas utilizadas se purificaron en fusión con GST, siguiendo el apartado 5.6.1 de estos Materiales y Métodos. Las reacciones se prepararon en un volumen final de 10  $\mu$ L, el cual contenía las proteínas purificadas (el efector de *S. enterica* correspondiente y el posible sustrato en estudio) en tampón de glicosilación<sup>34</sup>. La incubación se realizó 4 horas a temperatura ambiente, y después las reacciones se detuvieron añadiendo 5  $\mu$ L de tampón de *Laemmli* e hirviendo 5 minutos la muestra a 95°C, para analizar el resultado mediante *SDS-PAGE* y *western blot*.

<sup>34</sup>**Tampón de glicosilación:** Tris 50 mM (pH 7.4), MnCl<sub>2</sub> 10 mM, UDP-GlcNAc 1 mM y DTT 1 mM.

### **7.3 Ensayo de ubiquitilación *in vitro***

Las reacciones de ubiquitilación se realizaron en un volumen final de 20  $\mu$ L, que contenía tampón A (Tris-HCl 25 mM, NaCl 50 mM, ATP 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 0.1 mM, pH 7.5), 1  $\mu$ g de ubiquitina etiquetada con HA (HA-Ub), 0.25  $\mu$ g de la proteína humana recombinante E1 (Boston Biochem) y 1  $\mu$ g de E2 (proteína humana recombinante Ubch3b, de Boston Biochem), en ausencia o presencia de 0.5  $\mu$ g de las fusiones de SlrP (a etiqueta HA o GST) y las distintas proteínas humanas detectadas en el escrutinio de SlrP, en fusión con GST.

Las reacciones se incubaron a 37°C durante 1 hora, y se detuvieron con un cambio drástico de temperatura. Algunas reacciones se pararon mediante la adición de tampón de *Laemmli* y sometiénolas posteriormente a *SDS-PAGE*; mientras que otras pasaron por un proceso de cromatografía de afinidad para purificar los sustratos de la reacción de ubiquitilación, previo al *SDS-PAGE*. Se detectó la ubiquitilación de los sustratos utilizando anticuerpos monoclonales anti-HA.11 (*Enzo*).

## **8. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR**

### **8.1 Infección de células epiteliales**

La infección de células epiteliales HeLa se realizó con diferentes estirpes de *Salmonella enterica* para posteriormente extraer el ARN total de los cultivos y realizar el análisis transcriptómico en diferentes condiciones.

24 horas antes de la infección, se colocaron  $8 \times 10^5$  células HeLa en placas multipocillos de seis pocillos y se incubaron 24 horas a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub> en medio sin antibióticos. Las bacterias se cultivaron por separado en condiciones invasivas<sup>36</sup> y se añadieron al cultivo celular con una proporción, que se denomina MOI (del inglés *multiplicity of infection*), de 50:1. Se lavó el cultivo celular 1 hpi (hora post infección) dos veces con PBS, y se cubrió con medio DMEM suplementado con 100  $\mu$ g/mL de gentamicina durante una hora adicional. Así, se eliminaron todas las bacterias que no hubieran entrado en las células hospedadoras. A las 2 hpi, se volvieron a realizar dos lavados del cultivo con PBS y se cubrieron las células con DMEM

suplementado con 16 µg/mL de gentamicina, incubándose en este medio hasta el final de la infección.

<sup>36</sup>**Condiciones invasivas:** Bacterias cultivadas toda la noche en LB NaCl 0.3M, sin agitación ni aireación

## **8.2 Inmunofluorescencia y microscopía confocal**

Para estudiar el papel biológico de los efectores de la familia SseK sobre los microtúbulos, se realizaron experimentos de inmunofluorescencia con células transfectadas en diferentes condiciones.

Se dejaron crecer durante 24 horas las células HEK293T en cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro, previamente tratados con polilisina y esterilizados<sup>36</sup> en placas multipocillos de 24 pocillos. Una vez las células crecieron, se realizaron las transfecciones correspondientes (según el procedimiento explicado en el apartado 3.8.2). Cuando se alcanzó el pico de expresión de la transfección a las 48 horas, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente, de modo que las células se fijaban pero se preservó la fluorescencia de la GFP transfectada. Tras aspirar el fijador, las preparaciones se lavaron tres veces con PBS y se permeabilizaron las muestras con una incubación con tritón X-100 al 0.25% en PBS durante 5 minutos. Después, se lavaron las muestras secuencialmente con PBS y PBS-Tween (0.1%), y se incubaron 1 hora con tampón de bloqueo<sup>37</sup>.

Tras el bloqueo, se incubó con anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo en la proporción necesaria, durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la incubación con anticuerpo primario, se realizaron 6 lavados con PBS-Tween y se incubó con el anticuerpo secundario que corresponda, diluido en PBS-Tween en la proporción necesaria, durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Una vez finalizada la incubación con anticuerpos, se deshidrató la muestra incubándola 1 minuto con etanol 96% frío. Se retiró el etanol y se dejó secar la muestra al aire.

Entonces la muestra se montó sobre el portaobjetos y una gota de *ProLong™ Glass Antifade Mountant with NucBlue™ (Invitrogen)*, que conserva la muestra y tiñe el núcleo con el colorante *Hoescht 33342*. Se dejó toda la noche curando en oscuridad a temperatura ambiente y, finalmente, se selló.

El análisis de las muestras se realizó con un microscopio de epifluorescencia *Leica*. Las células fueron incubadas con anticuerpo primario anti-acetil- $\alpha$ -tubulina y con anticuerpo secundario Alexa Fluor Plus 594 (**ver Tabla M.6**). La cuantificación de la señal de acetil- $\alpha$ -tubulina se realizó sobre las imágenes de microscopía de epifluorescencia sobre células individuales, tomadas con los mismos parámetros. Las imágenes se analizaron con el software *ImageJ* (Schneider et al., 2012).

<sup>36</sup>**Tratamiento con polilisina y esterilización de cubreobjetos:** Se colocan los cubreobjetos en los pocillos de la placa multipocillos de 24 pocillos y se les hacen dos lavados de 10 minutos con etanol 70% y 100%, respectivamente. Se retira el etanol y, tras dos lavados con PBS para eliminar los restos, se

Se cubren con polilisina (*poly-L-lysine* 1%, de *Sigma*) al 0.01% en PBS durante 5 minutos. Posteriormente, se hacen dos lavados con PBS y se esteriliza la placa mediante iluminación con luz UV.

<sup>37</sup>**Tampón de bloqueo para inmunofluorescencia:** BSA al 3% (p/v) en PBS-Tween 0.1% (v/v).

## 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de las imágenes de fluorescencia se llevó a cabo con el programa *Prism 6.0* (*GraphPad Software*, San Diego, CA, USA) mediante el uso del test no paramétrico de *Kolmogorov-Smirnov*, para determinar la significación estadística de las diferencias entre las condiciones planteadas.

Para el análisis de los datos obtenidos del microarray, se consideraron significativas aquellas diferencias con un valor  $p < 0.05$  en la prueba ANOVA, ya que este valor representa la probabilidad de que un cambio en la expresión de un gen se deba al azar.

# Resultados

---





# Capítulo 1

## **Análisis de la relación entre SseK1 y las proteínas diana del hospedador**

---



Como se ha descrito en la introducción, en un escrutinio previo realizado en el marco de la tesis del Dr. Baisón Olmo se identificaron varias proteínas humanas candidatas a interactuar con el efector SseK1 de *S. Typhimurium* (**Tabla I3**). De entre ellas, se seleccionaron para un estudio con mayor profundidad aquellas dos que nos resultaron particularmente interesantes: TBCB y ZBTB16. Los genes que codifican estas proteínas aparecieron en numerosas ocasiones en el escrutinio, y en ambos casos los diferentes clones contenían fragmentos de diferente tamaño del gen. Estos dos hechos reforzaban la idea de que la interacción detectada pudiera ser real y específica.

La proteína codificada por el gen *TBCB* se denomina cofactor B de unión a tubulina. Forma parte de una familia de cinco cofactores que, mediante la interacción con  $\alpha$ - o  $\beta$ - tubulina, controlan la formación de dímeros de tubulina (Lopez-Fanarraga et al., 2001; Tian et al., 1996). TBCB por sí misma no es capaz de interactuar con la tubulina o disociarla. Sin embargo, se ha demostrado que TBCB se asocia con TBCE tanto *in vitro* como *in vivo* y, a su vez, forman un complejo con  $\alpha$ -tubulina, cuya consecuencia es la disociación de polímeros de tubulina, contribuyendo de este modo a la regulación de la dinámica de microtúbulos (Kortazar et al., 2007). La magnitud de la importancia de esta proteína también se puede medir en los problemas derivados cuando muta o pierde su regulación, como por ejemplo procesos neurodegenerativos o cáncer (Vadlamudi et al., 2013; Wang et al., 2005).

El gen *ZBTB16*, también denominado *PLZF*, codifica un factor de transcripción de la familia de las proteínas de dedos de zinc, y contiene nueve dominios de estos motivos tipo Krüppel (Chen et al., 1995). Interviene tanto en la activación como en la represión de la expresión de genes, afectando a múltiples procesos como la regulación del crecimiento o la diferenciación celular (Kolesnichenko and Vogt, 2011). El producto del gen *ZBTB16* se une a secuencias específicas de ADN a través de su extremo carboxilo, donde se encuentran los dominios de dedos de zinc y recluta otros agentes desde su extremo amino, para así acabar ejerciendo su función reguladora. Su localización es nuclear, y tiene diferentes patrones de expresión según el tipo celular (Li et al., 1997; Xu et al., 2009).

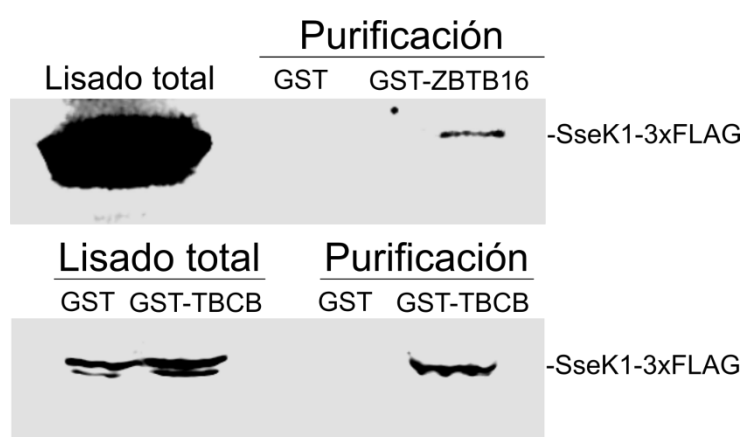
### **1.1 Confirmación de las interacciones SseK1-TBCB y SseK1-ZBTB16**

Las interacciones se obtuvieron mediante el sistema del doble híbrido en levaduras. Aquí se trató de verificarlas mediante dos aproximaciones independientes: cromatografía de afinidad y coinmunoprecipitación. Para los experimentos de purificación por afinidad se usó la estirpe SV7071 (**Tabla M.1**), la cual lleva la secuencia que codifica el epítipo 3xFLAG fusionada en el extremo 3' del gen *sseK1*. Esta estirpe de *Salmonella* se transformó con el plásmido pGEX-4T-1, que expresa la proteína GST y los vectores pIZ3509 y pIZ2331, que expresan la fusión de GST con TBCB en el vector pGEX-4T-1 y la fusión de GST con ZBTB16 en el vector pGEX-4T-2, respectivamente.

Las estirpes de *Salmonella* transformadas con los diferentes vectores se cultivaron en agitación a 37°C durante toda la noche. A la mañana siguiente, el cultivo saturado se diluyó en proporción 1:10 en medio LB y se incubó durante una hora en agitación a 37°C. En ese momento, se suplementó el medio LB con IPTG a una concentración de 1 mM y se mantuvo a

37°C en agitación durante 3 horas, condiciones que permitieron inducir la expresión de las proteínas GST y de fusión. Posteriormente, las bacterias se lisaron mediante sonicación en tampón NP40 y se obtuvo la fracción soluble mediante centrifugación.

Para la purificación de las proteínas del hospedador fusionadas a GST se usó una matriz de agarosa con glutatión. La proteína GST tiene gran afinidad por el glutatión, y gracias a esta propiedad las proteínas de fusión se unen específicamente a la matriz empleada. Tras esta purificación se analizó la posible copurificación de SseK1-3xFLAG mediante *western blot* usando anticuerpos anti-FLAG. Tal y como se observa en la **Figura R.1.1**, SseK1-3xFLAG se copurificó tanto con TBCB como con ZBTB16, mientras que no ocurrió lo mismo con GST, demostrando de este modo la especificidad de ambas interacciones.

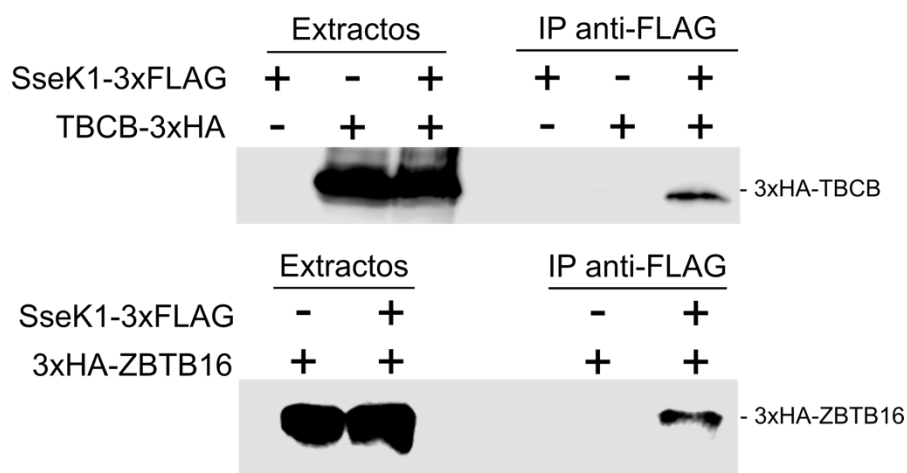


**Figura R.1.1. SseK1 interacciona con TBCB y ZBTB16 en bacterias.** Se realizaron extractos en tampón de lisis NP40 de la estirpe SV7071 (14028 *sseK1::3xFLAG*) que expresaban la proteína GST o bien la fusión de TBCB o ZBTB16 a dicha proteína. GST y las proteínas de fusión se aislaron mediante cromatografía de afinidad con una matriz de glutatión-agarosa. Tras varios lavados para eliminar uniones inespecíficas, las proteínas se eluyeron en tampón de *Laemmli* y se separaron en un gel de poliacrilamida mediante electroforesis. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se revelaron utilizando anticuerpos monoclonales anti-FLAG. Como control de la expresión de SseK1-3xFLAG se usaron alícuotas de lisados totales.

El resultado descrito anteriormente nos permite confirmar la interacción de SseK1 con TBCB y ZBTB16 por un método independiente. Sin embargo, el contexto fisiológico donde deberían darse dichas interacciones sería la célula hospedadora, así que se decidió analizar la interacción del efector SseK1 y las dos proteínas del hospedador en ese escenario, mediante experimentos de coimmunoprecipitación, utilizando extractos de células de mamífero. Con tal fin, se cotransfectaron células HeLa con diferentes construcciones que permitieron expresar cada una de las proteínas de interés fusionada a un epítipo diferente. Por un lado, se expresó la fusión SseK1-3xFLAG, desde el plásmido pI22047, que es un derivado del vector pBABE puro. Por otro lado, se expresaron las fusiones 3xHA-TBCB y 3xHA-ZBTB16 desde los vectores derivados del plásmido pCS2, pI23423 y pI22352, respectivamente.

A las 24 horas de la transfección, tiempo en que se produce el pico de expresión de las proteínas, se prepararon lisados celulares en tampón de lisis NP40 y se inmunoprecipitó SseK1-

3xFLAG utilizando anticuerpos monoclonales anti-FLAG, para posteriormente analizar mediante *western blot* la presencia de las proteínas humanas fusionadas a la etiqueta 3xHA. Se puede observar en la **Figura R.1.2** que tanto TBCB como ZBTB16 coinmunoprecipitan con SseK1. Se realizó el mismo procedimiento realizando transfecciones con un único vector como control de la especificidad de las interacciones.



**Figura R.1.2. SseK1 interacciona con TBCB y ZBTB16 en la célula hospedadora.** Se transfectaron de forma transitoria células HeLa con 5 µg de los vectores correspondientes para expresar SseK1-3xFLAG o las proteínas humanas en fusión con 3xHA. Las células transfectadas se lisaron con tampón de lisis NP40 y se inmunoprecipitaron (IP) con anticuerpos anti-FLAG. Tras varios lavados, las proteínas se eluyeron en tampón de *Laemmli* y se separaron en un gel de poliacrilamida mediante electroforesis. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se revelaron utilizando anticuerpos anti-HA conjugados con peroxidasa. Se incluyeron alícuotas de los extractos totales de las células transfectadas como control de expresión.

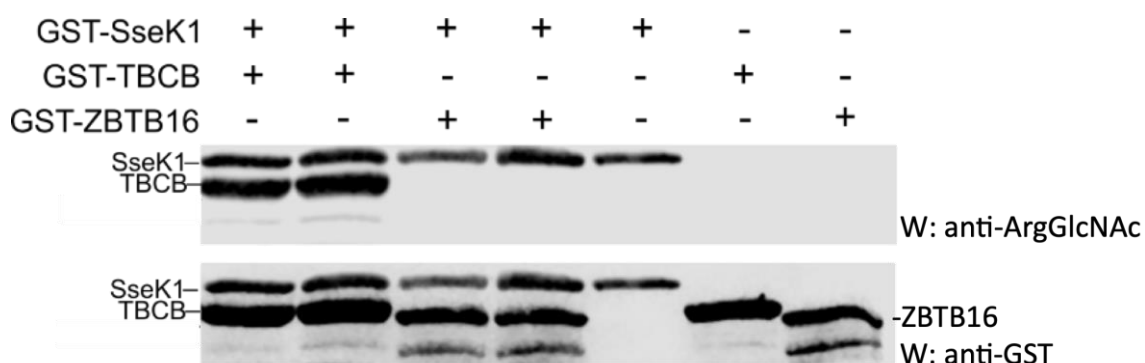
## 1.2 Actividad catalítica de SseK1 en ensayos *in vitro*

SseK1 pertenece a una familia de efectores con actividad glicosiltransferasa presente en varias especies bacterianas. Además de los efectores de *Salmonella* SseK1, SseK2 y SseK3, a esta familia pertenecen también el efector NleB de *Citrobacter rodentium* y los efectores NleB1 y NleB2 de *E. coli* enteropatógena y enterohemorrágica (Araujo-Garrido et al., 2020). Mediante la glicosilación con N-acetilglucosamina a residuos específicos de arginina de proteínas que contienen dominios de muerte, estos efectores impiden la activación de la vía NF-κB y la inducción de apoptosis en el hospedador tras la infección por el patógeno (Günster et al., 2017; Li et al., 2013)

Una vez confirmadas las interacciones entre SseK1 y las proteínas del hospedador mediante experimentos independientes, se procedió a analizar si dichas proteínas podrían ser sustratos de su actividad glicosiltransferasa mediante un ensayo de transferencia de N-acetilglucosamina *in vitro*.

Para las reacciones de transferencia de N-acetilglucosamina se utilizaron las distintas proteínas (tanto los efectores como las proteínas del hospedador) purificadas en fusión con GST. Se ensayó la modificación *in vitro* de SseK1 sobre TBCB y sobre ZBTB16 por duplicado, utilizando

como controles reacciones paralelas con todos los componentes con la excepción de añadir sólo el efector o las proteínas candidatas por separado (**Figura R.1.3**).



**Figura R.1.3. SseK1 modifica a TBCB *in vitro*.** Se muestran las reacciones de transferencia de N-acetilglucosamina a residuos de arginina por parte de SseK1 con las dos proteínas humanas, que fueron sometidas a SDS-PAGE y se analizaron mediante *western blot* utilizando anticuerpos monoclonales para residuos de arginina modificados con N-acetilglucosamina (ArgGlcNAc). La membrana fue reincubada con anticuerpos anti-GST como control de la presencia de las diferentes proteínas en cada reacción.

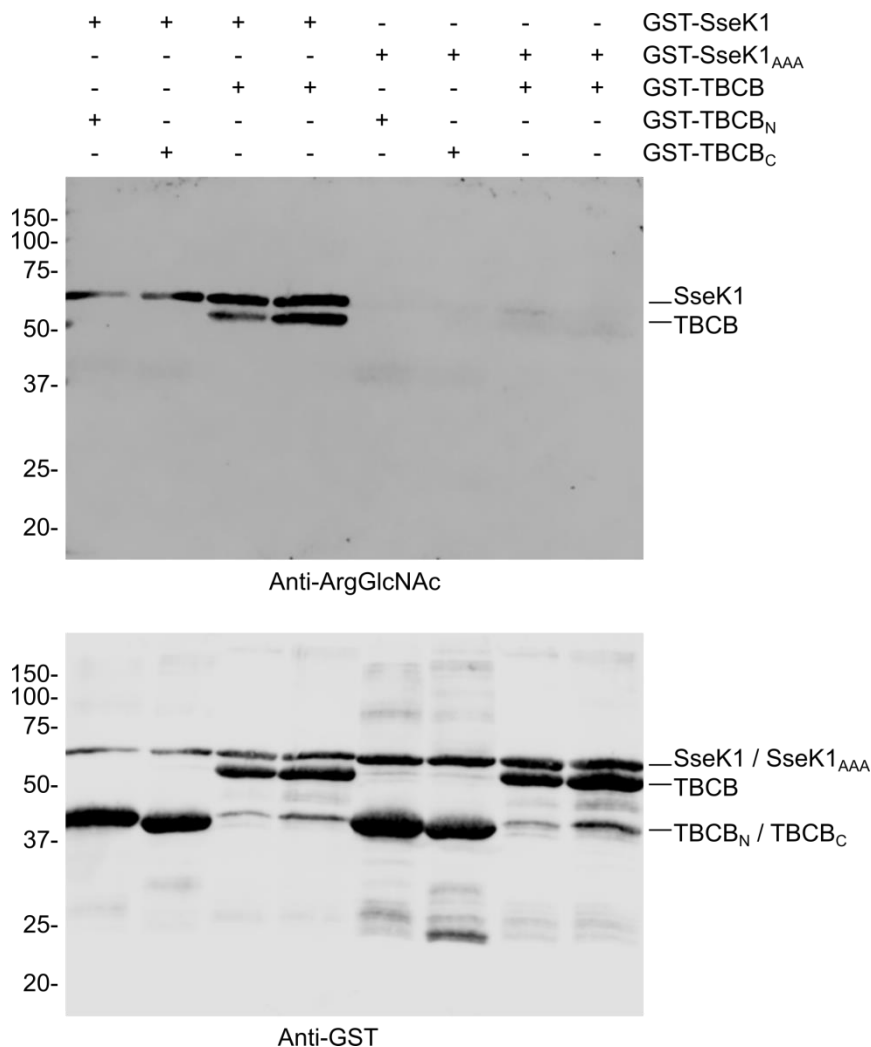
Tal y como se observa en la **Figura R.1.3**, SseK1 es capaz de utilizar TBCB como sustrato de su actividad catalítica, y por tanto resulta modificada por la adición de N-acetilglucosamina. No sucede lo mismo con ZBTB16, cuya presencia en las reacciones también se observa de forma clara pero no presenta la modificación. Por último, también se observa que SseK1 es capaz de ejercer su actividad catalítica sobre sí mismo, tanto en presencia de las proteínas del hospedador como en solitario. Esta actividad autocatalítica de este tipo de efectores se ha descrito previamente en otros trabajos (Newson et al., 2019; Xue et al., 2020) y se sugiere como necesaria para el normal desarrollo de la patogénesis por parte de *S. enterica* (S et al., 2021).

Se ha descrito que el dominio DxD de SseK1 es fundamental para su actividad catalítica, y en caso de ser modificado esta actividad se pierde por completo (Günster et al., 2017). Por ello, se analizó si el motivo DxD de SseK1 es esencial también para su actividad sobre este nuevo sustrato, y para ello se construyó el plásmido pIZ3518, que codifica una versión de SseK1 con su dominio catalítico mutado (D223A/D225A) en fusión con GST.

Además, se hicieron esfuerzos para determinar el aminoácido específico de TBCB que es modificado por SseK1. La familia de efectores con actividad transferasa de N-acetilglucosamina presenta una mayor afinidad por los sustratos que presentan un motivo WR intacto, modificando la arginina de dicho motivo (Park et al., 2018). En el caso de TBCB, en toda su secuencia de aminoácidos no tiene ningún motivo WR. Atendiendo al único residuo de triptófano con el que cuenta (W192), la arginina más cercana se encuentra separada por varios aminoácidos (R196), la cual supusimos el candidato más probable de ser sujeto de la modificación por parte de SseK1. Por ello, también se analizó si la modificación de SseK1 sobre TBCB ocurría específicamente sobre R196. Con tal fin se construyó el plásmido pIZ3515, que codifica la proteína TBCB en fusión con la proteína GST, pero en este caso porta una modificación puntual para sustituir la arginina R196 por un aminoácido de alanina (R196A).

Por otro lado, se utilizaron versiones truncadas de TBCB, con sus dominios por separado, para determinar regiones importantes en su papel de sustrato de la actividad catalítica de SseK1. TBCB contiene dos dominios bien caracterizados, en la región C-terminal se encuentra un péptido rico en glicina que se asocia al citoesqueleto (*CAP-Gly*) (Watanabe et al., 1996) y en la región N-terminal el dominio similar a ubiquitina (*Ubl*) (Lytle et al., 2004). Las versiones truncadas de TBCB utilizadas se diseñaron de la misma forma que en (Tan et al., 2017), de modo que se tenía el fragmento TBCB-N, con los primeros 125 aminoácidos e incluía la región N-terminal, y el fragmento TBCB-C, con los 119 aminoácidos restantes de la proteína del hospedador, que en este caso incluye la región C-terminal.

Se llevó a cabo un nuevo ensayo de glicosilación *in vitro* para probar las diferentes combinaciones descritas anteriormente, obteniéndose los resultados de la **Figura R.1.4**.



**Figura R.1.4. Ensayo *in vitro* con diferentes variantes de SseK1 y TBCB.** Se muestran las reacciones de transferencia de N-acetilglucosamina a residuos de arginina por parte de SseK1 y SseK1<sub>AAA</sub> frente a TBCB o sus dominios por separado. Las reacciones fueron sometidas a SDS-PAGE y se analizaron mediante *western blot* utilizando anticuerpos monoclonales para residuos de arginina modificados con N-acetilglucosamina (ArgGlcNAc). La membrana fue reincubada con anticuerpos anti-GST para detectar la presencia de las diferentes proteínas en cada reacción.

Los resultados representados en la **Figura R.1.4** indican que SseK1 es incapaz de modificar las versiones truncadas de TBCB a la que les falta alguno de sus dominios, ya sea en el extremo amino o carboxilo, por lo que se concluye que el efector de *Salmonella* necesita que en este caso la proteína sustrato se encuentre completa para su reconocimiento y modificación.

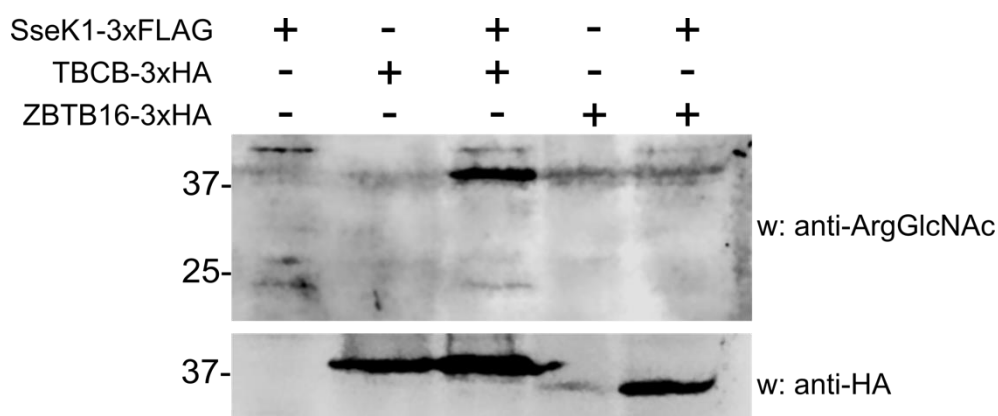
De los resultados obtenidos se extrae también que el residuo de arginina R196 de TBCB no es el aminoácido específico modificado por la actividad catalítica de SseK1, o al menos no es el único, ya que el nivel de modificación de TBCB con mutación puntual y sin mutación puntual es prácticamente idéntico. También se puede concluir, a raíz del mismo resultado, que el residuo R196 no es determinante en TBCB para su reconocimiento y modificación por parte de SseK1.

Por último, también se observa en la **Figura R.1.4** que SseK1 con el dominio DxD mutado a AAA es completamente no funcional, de modo que pierde toda capacidad de modificar a TBCB (mutante y no mutante) e incluso a sí misma.

### 1.3 Actividad catalítica de SseK1 sobre las proteínas diana en el hospedador

Después de obtener los resultados de la actividad catalítica de SseK1 en los ensayos *in vitro*, se procedió a analizar su actividad en un experimento que recrea las condiciones de forma más fisiológica, dentro de células epiteliales. Para ello, se transfectaron células HEK293T con las construcciones pIZ3423, pIZ2352 y pIZ2047 para expresar de nuevo las proteínas del hospedador TBCB y ZBTB16 con el epítipo 3xHA y el efector SseK1 con el epítipo 3xFLAG, respectivamente.

Se realizaron extractos celulares en tampón de lisis NP40 y se analizó mediante *western blot* la actividad enzimática de SseK1 en células que expresaban el propio efector y también junto con las proteínas hospedadoras TBCB o ZBTB16, mediante el uso de un anticuerpo que reconoce específicamente residuos de arginina a los que se ha transferido N-acetilglucosamina.

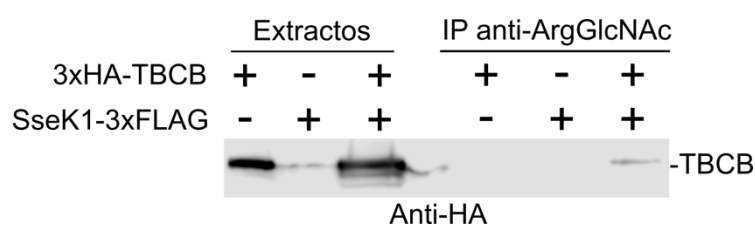


**Figura R.1.5. SseK1 modifica *in vivo* a TBCB pero no a ZBTB16.** Se analizaron mediante *western blot* los extractos de las diferentes transfecciones con anticuerpos que detectan residuos de arginina con N-acetilglucosamina (ArgGlcNAc). La misma membrana se reincubó con anticuerpos anti-HA para verificar la expresión de las proteínas del hospedador.



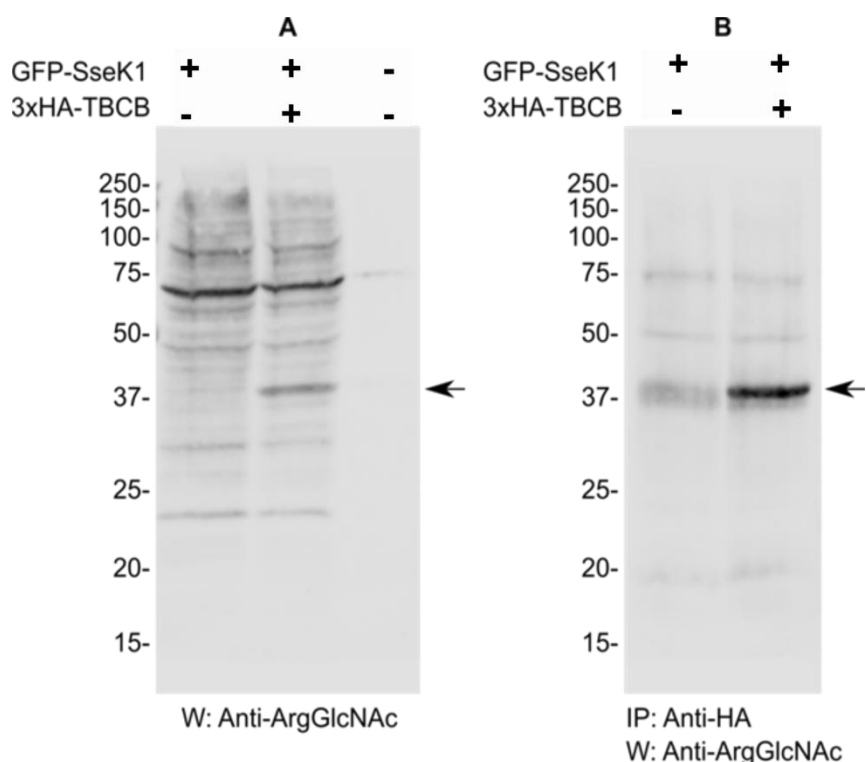
Tal y como se aprecia en la **Figura R.1.5**, la expresión de SseK1 tras la transfección hace que se detecten diferentes bandas correspondientes a proteínas modificadas por un residuo de N-acetilglucosamina. Cuando SseK1 es coexpresada con 3xHA-TBCB se detecta una banda adicional, correspondiente en peso molecular a la proteína del hospedador, aportando otra prueba de que es un sustrato de la actividad catalítica de SseK1.

Para corroborar que efectivamente era la proteína candidata la que resultaba modificada, se realizó una inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-ArgGlcNAc de todas las proteínas modificadas por SseK1 y se analizó mediante western la presencia de la fusión 3xHA-TBCB, como se muestra en la figura R.1.6. Dicha proteína de fusión se inmunoprecipitó con los anticuerpos específicos para la modificación en el caso de la cotransfección con SseK1-3xFLAG y no en ningún otro, por lo que el uso de TBCB como sustrato de la actividad enzimática del efector se confirmó.



**Figura R.1.6. Confirmación de la modificación de TBCB in vivo por parte de SseK1.** Se realizó un *western blot* utilizando anticuerpos anti-HA para analizar extractos de transfecciones de células HEK293T que habían pasado por un proceso de inmunoprecipitación utilizando anticuerpos anti-ArgGlcNAc. Se utilizaron como controles transfecciones simples y alícuotas de los extractos antes de someterlos a la inmunoprecipitación.

Como última comprobación de que efectivamente TBCB es una nueva proteína del hospedador que es modificada por SseK1, se realizó otra inmunoprecipitación pero del modo contrario al realizado anteriormente: tras ver una banda adicional en las modificaciones producidas por SseK1 al coexpresar 3xHA-TBCB se incuban los extractos con anticuerpo anti-HA para capturar la fusión 3xHA-TBCB y posteriormente se analizó si esta proteína estaba modificada con anticuerpos anti-ArgGlcNAc (**Figura R.1.7**).

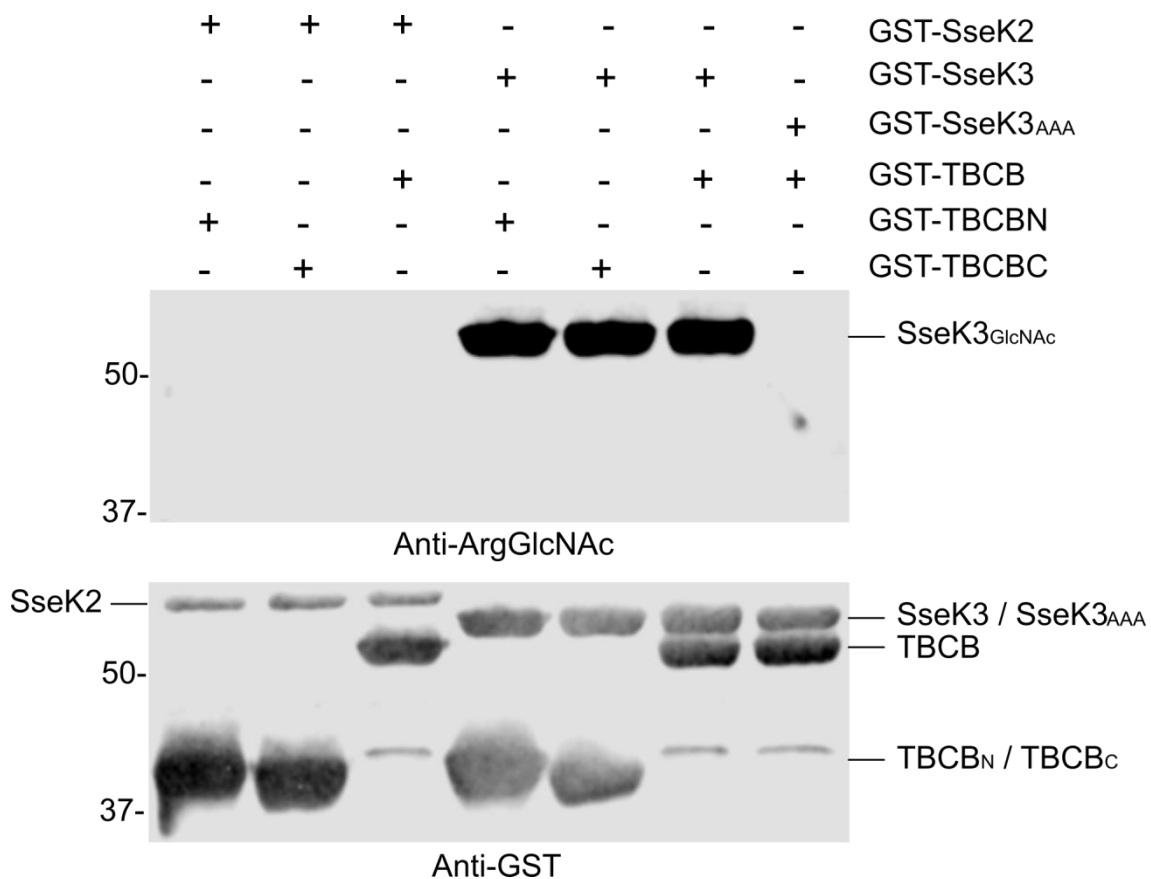


**Figura R.1.7. Inmunoprecipitación de TBCB in vivo y análisis de su modificación.** Se realizó un *western blot* utilizando anticuerpos anti-ArgGlcNAc para analizar extractos de transfecciones de células HEK293T que habían pasado por un proceso de inmunoprecipitación utilizando anticuerpos anti-HA. Se utilizaron como controles transfecciones simples y alícuotas de los extractos antes de someterlos a la inmunoprecipitación.

#### 1.4 Análisis de otros efectores de la familia de SseK1

*Salmonella enterica* codifica otros dos efectores de la familia de SseK1: SseK2 y SseK3 (Brown et al., 2011; Kujat Choy et al., 2004). Para ambos se ha descrito la misma actividad catalítica que para SseK1, transferasa de N-acetilglucosamina a residuos de arginina de las proteínas sustrato. SseK3, al igual que SseK1, inhibe la activación de la señalización NF- $\kappa$ B inducida por la infección de *Salmonella*, mientras que no se aprecia con claridad esta función en SseK2 (Günster et al., 2017). Debido a la similitud entre las secuencias de estos efectores, decidimos estudiar el nivel de especificidad de SseK1 en su interacción con TBCB y se realizaron diferentes ensayos de interacción y modificación, incluyendo los demás efectores de la misma familia.

El primero de estos ensayos fue de nuevo un experimento de glicosilación *in vitro*, para comprobar la actividad transferasa de N-acetilglucosamina de SseK2 y SseK3 utilizando como sustrato a TBCB. También se ensayaron como sustratos las versiones truncadas de TBCB de nuevo, TBCB-N y TBCB-C, descritas en el apartado 1.2 de este capítulo.

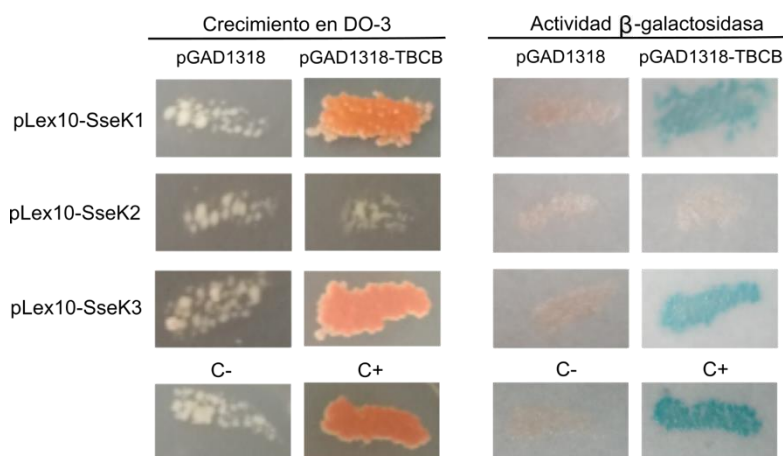


**Figura R.1.8. Ensayos de glicosilación de TBCB *in vitro* con SseK2 y SseK3.** Se muestran las reacciones *in vitro* de transferencia de N-acetilglucosamina a residuos de arginina de las diferentes variantes de TBCB, por parte de SseK2, SseK3 y SseK3<sub>AAA</sub>. Las reacciones fueron sometidas a SDS-PAGE y se analizaron mediante *western blot* utilizando anticuerpos monoclonales para residuos de arginina modificados con N-acetilglucosamina (ArgGlcNAc). La membrana fue reincubada con anticuerpos anti-GST como control de la presencia de las diferentes proteínas en cada reacción.

Atendiendo al resultado de la **Figura R.1.8**, se observa que tanto SseK2 como SseK3 son incapaces de modificar a TBCB mediante una reacción *in vitro*. Es más, no se aprecia actividad catalítica alguna para SseK2, mientras que SseK3 es capaz de ejercer su actividad de transferasa de N-acetilglucosamina sobre sí misma, al igual que SseK1. En la misma imagen también se aprecia que, al igual que pasa con SseK1, cuando a SseK3 se le modifica el dominio DxD pierde su actividad catalítica, por lo que la señal de la modificación ejercida sobre sí misma desaparece.

La no modificación de TBCB *in vitro* por parte de los efectores de la familia de SseK1 no implica que no haya ningún tipo de relación entre estas proteínas, ya que puede darse el caso de que exista una interacción entre efector y proteína del hospedador pero esta última no resulte ser un sustrato de la actividad enzimática del efector. Así resulta la relación entre el efector SseK3 y TRIM32, una ligasa de ubiquitina del hospedador. Se ha demostrado la interacción entre ambas proteínas, aunque SseK3 no ejerce modificación alguna sobre TRIM32 (Yang et al., 2015). También se ha visto un resultado similar en esta misma tesis para el efector SseK1 con la proteína del hospedador ZBTB16, dado que se aprecia interacción entre las proteínas (**Figura R.1.2**) pero SseK1 no utiliza a ZBTB16 como sustrato de su actividad enzimática (**Figura R.1.3** y

**Figura R.1.5).** Por tanto, se procedió a analizar también la posible interacción de SseK2 y SseK3 con TBCB. Dicho análisis se realizó a través de un ensayo de doble híbrido en levaduras, que se muestra en la **Figura R.1.9**.



**Figura R.1.9. Análisis de las interacciones de los efectores de la familia SseK1 con TBCB mediante el sistema del doble híbrido en levaduras.** Se muestra el crecimiento, o su ausencia, en medio selectivo sin histidina y la actividad  $\beta$ -galactosidasa de *S. cerevisiae* L40 cuando expresa los tres efectores de la familia de SseK1 en el vector pLEX10, y con TBCB expresada en el vector pGAD1318 (utilizando pGAD1318 vacío como control). Se usaron levaduras con los dos vectores vacíos como control negativo (C-) y la interacción entre Raf y Ras<sup>V12</sup> como control positivo (C+).

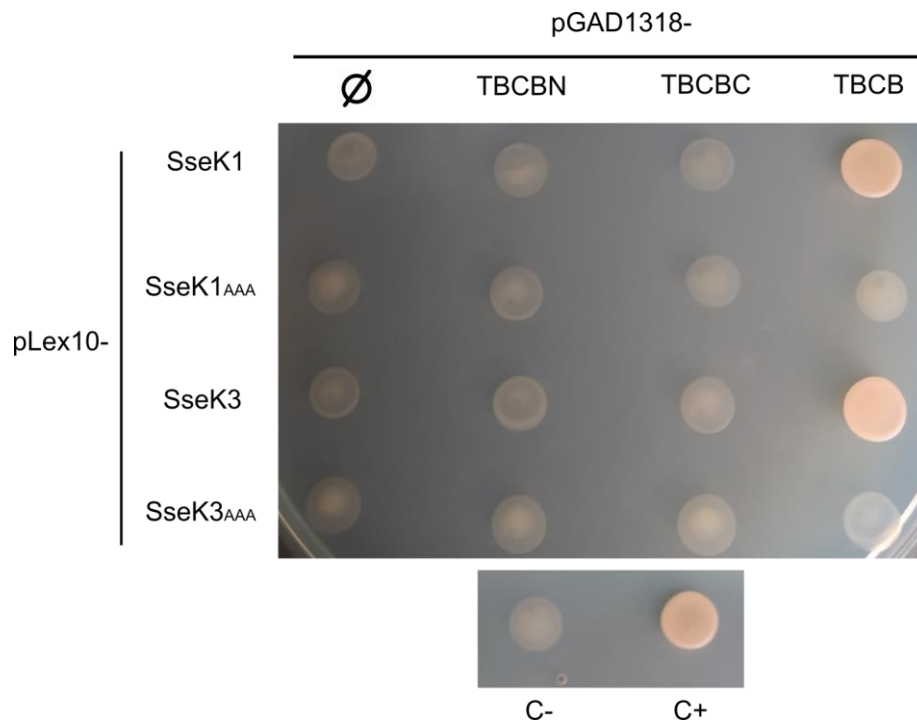
Además de la interacción entre SseK1 y TBCB, previamente descrita en este trabajo, se observa que también existe interacción entre SseK3 y TBCB. Esta interacción, a pesar de que es específica, no tiene como consecuencia que SseK3 desarrolle su actividad catalítica utilizando TBCB como sustrato (**Figura R.1.8**), lo cual no excluye algún tipo de papel de este efector relacionado con las funciones de TBCB.

Respecto al efector SseK2, en la **Figura R.1.9** se observa que no existe una interacción entre este efector y TBCB. Este resultado, junto con los anteriores en los cuales no se le detecta a SseK2 capacidad de modificar *in vitro* a TBCB, ni tampoco se le detecta actividad autocatalítica (**Figura R.1.8**) hizo que se decidiera no continuar con SseK2 en el presente estudio.

Está descrito en (Yang et al., 2015) que, además de producirse interacciones entre efectores y proteínas del hospedador sin necesidad de que se produzca una modificación sobre estas últimas, el dominio catalítico de SseK3 es esencial para su interacción con TRIM32, y cuando dicho dominio es modificado la interacción se pierde. Sucede lo mismo para la interacción entre NleB1, un efector secretado por *E. coli* enteropatógena que también tiene actividad transferasa de N-acetilglucosamina, y la proteína humana TRADD, una proteína con dominio de muerte asociado al TNFR1 (receptor de tipo 1 del factor de necrosis tumoral): cuando el dominio catalítico es mutado, el efector es incapaz de unirse a la proteína del hospedador (Li et al., 2013).

Con estos antecedentes, se analizaron los casos que se han estado describiendo en esta Tesis: se ensayó mediante la técnica de doble híbrido en levaduras la interacción de los efectores SseK1 y SseK3 (y sus respectivos mutantes catalíticos) con la proteína del hospedador TBCB y sus dominios funcionales por separado, los cuales no son sustratos de la actividad enzimática

de los efectores (**Figura R.1.4** y **Figura R.1.8**) pero no se había ensayado la interacción.



**Figura R.1.10. Análisis de las interacciones de los mutantes catalíticos de SseK1 y SseK3 con TBCB mediante el sistema del doble híbrido en levaduras.** Se muestra el crecimiento (o su ausencia) de *S. cerevisiae* L40 en medio selectivo sin histidina. La levadura expresa los efectores SseK1 y SseK3, o sus respectivos mutantes catalíticos, en el vector pLEX10; también expresa la proteína TBCB o sus versiones truncadas en el vector pGAD1318. Se usaron levaduras con los dos vectores vacíos como control negativo (C-) y la interacción entre Raf y Ras<sup>V12</sup> como control positivo (C+)

Tal y como se observa en la **Figura R.1.10**, no se aprecia interacción de ninguno de los dos efectores con los dominios de TBCB por separado. Además, podemos concluir que la integridad del sitio catalítico de ambos efectores es esencial para la interacción con la proteína eucariota, al igual que en los otros casos descritos anteriormente.

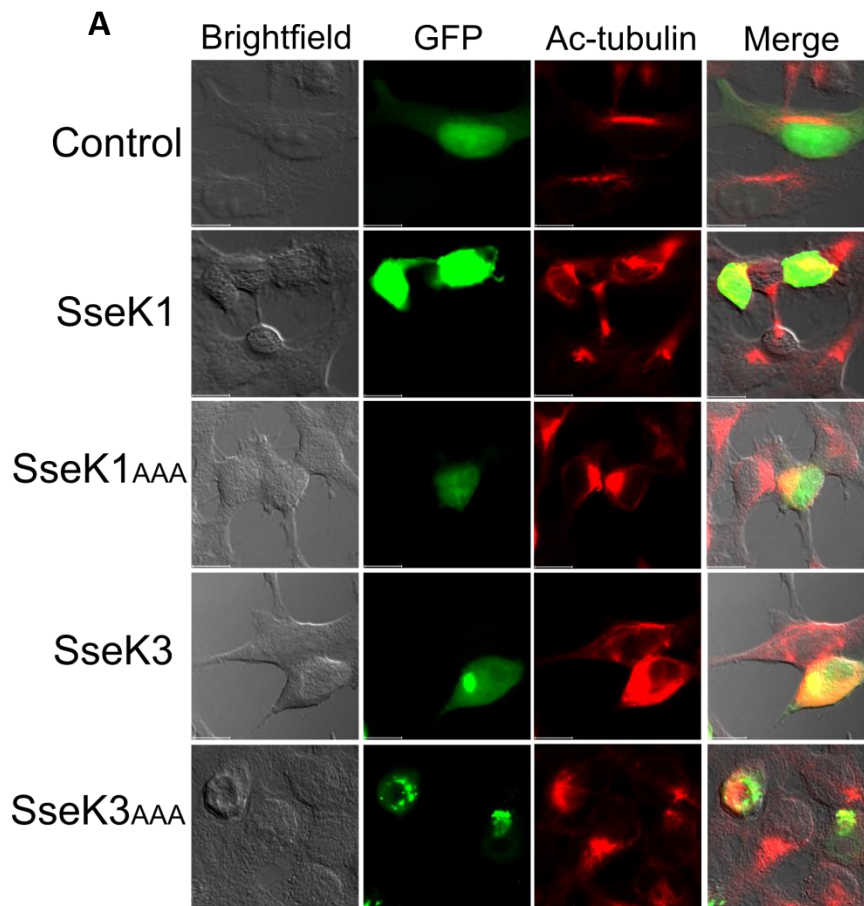
### 1.5 Efecto de SseK1 y SseK3 en el hospedador

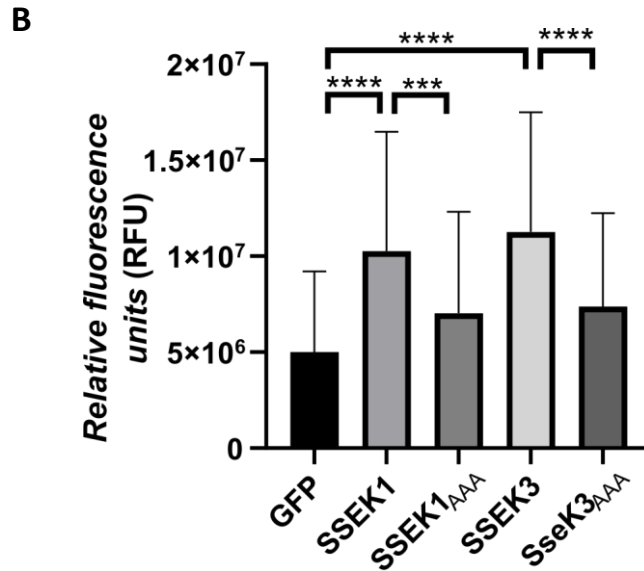
Ya se ha descrito con anterioridad el rol que desempeñan en el proceso de infección los efectores que forman parte de esta misma familia. El efecto más ampliamente descrito es la inhibición de la ruta NF-κB en el hospedador, con el objetivo final de evitar la apoptosis celular durante la infección. Concretamente, en el caso de *S. Typhimurium*, se ha comprobado que la expresión heteróloga de SseK1 en células eucariotas interfiere en la señalización de la ruta NF-κB mediada por TNFα y ejerce su actividad catalítica sobre TRADD (Li et al., 2013). Asimismo, se ha descrito también que la expresión de SseK3 en células del hospedador provoca la reducción de la activación de la ruta NF-κB, a través de TNFα (Yang et al., 2015). En el transcurso de una infección en macrófagos, tanto SseK1 como SseK3 impiden la activación por *Salmonella* de la ruta NF-κB, además de interferir en la estimulación de la muerte celular por necroptosis (Günster et al., 2017).

El cofactor TBCB está implicado en la dinámica de microtúbulos. Esta proteína forma un heterodímero junto con el cofactor TBCE, de forma que ambos cofactores colaboran en la disociación de los dímeros de tubulina y en la despolimerización de los microtúbulos, promoviendo que su distribución cambie (Kortazar et al., 2007). El hecho de que SseK1 y SseK3 interactúen con TBCB sugiere la posibilidad de que pudieran influir de alguna forma en la dinámica de microtúbulos.

La tubulina está sujeta a diferentes modificaciones postraduccionales. Una de ellas es la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina (una unidad básica en la estructura de los microtúbulos) que está relacionada con el incremento de la estabilidad de los microtúbulos (Webster and Borisy, 1989a).

Para probar si existe una relación entre SseK1, SseK3 y la estabilidad de los microtúbulos, se analizó en células HEK293T individuales mediante microscopía de fluorescencia si se producían cambios en los niveles de acetilación de  $\alpha$ -tubulina cuando se expresaban ectópicamente los efectores. Para ello, se transfectaron las células con construcciones del vector pEGFP-C1 en la que se expresaban SseK1, SseK3 o sus versiones mutadas en el dominio catalítico DxD (**Figura R.1.11**).





**Figura R.1.11. Microscopía de fluorescencia de células HEK293T.** Las células HEK293T se transfecaron con el vector pEGFPC1 vacío o derivados del mismo que expresaban los efectores SseK1, SseK3 y sus mutantes catalíticos, fusionados a la proteína GFP. A las 48 horas, se fijaron y se sometieron a un protocolo de inmunofluorescencia. **(A)** Se muestra de cada grupo una imagen representativa de los canales de campo claro (gris), el marcaje GFP (verde) y el marcaje de acetilación de tubulina (rojo), junto con la imagen combinada de los tres canales. Barra de escala: 11  $\mu$ m. **(B)** Cuantificación de los valores de intensidad obtenidos para cada grupo de muestras. De cada una de las condiciones se analizaron 100 células fluorescentes y se representaron la media de los valores de intensidad obtenidos en RFU (*relative fluorescence units*) y la desviación estándar. Para las comparaciones señaladas: \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ ; utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov.

Se puede apreciar en la **Figura R.1.11** que tanto la expresión de SseK1 como la de SseK3 incrementó significativamente el nivel de microtúbulos acetilados. Además, cuando se muta el dominio catalítico de los efectores este incremento resulta menor, asemejándose al producido por el vector vacío, lo que sugiere que ese dominio es importante para la alteración de la dinámica de microtúbulos de la célula hospedadora inducida por estos efectores.





## **Capítulo 2**

### **Identificación de sustratos potenciales de SlrP en la célula hospedadora**

---



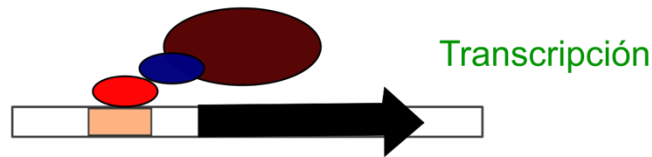
SlrP es otra proteína efectora translocada por los T3SS de *S. enterica*. El gen *slrP*, que está localizado fuera de las islas de patogenicidad del genoma de *S. enterica*, codifica una proteína de 765 aminoácidos, en la que se distinguen tres dominios: un dominio N-terminal que contiene la secuencia señal para que la proteína se secrete a través de los dos sistemas de secreción tipo III de *Salmonella*, T3SS-1 y T3SS-2 (Miao and Miller, 2000); un dominio central que contiene 11 copias de un motivo rico en leucina (denominado LRR, del inglés *Leucine-Rich Repeat*), los cuales suelen estar implicados en la interacción con otras proteínas (Kobe and Kajava, 2001); y un dominio C-terminal NEL (Novel E3 Ubiquitin Ligase) que tiene actividad ligasa de ubiquitina (Bernal-Bayard and Ramos-Morales, 2009).

Al igual que muchos otros efectores, SlrP lleva a cabo su papel biológico a través de su interacción con proteínas de la célula hospedadora. En estudios previos del laboratorio se describieron dos proteínas humanas que interactúan con SlrP: la tiorredoxina humana Trx1, que además es sustrato de su actividad ligasa de ubiquitina (Bernal-Bayard and Ramos-Morales, 2009); y ERdj3, una chaperona del retículo endoplásmico (Bernal-Bayard et al., 2010). Sin embargo, la hipótesis de partida para este capítulo fue que debía haber otros sustratos del efector que no se han descrito hasta ahora. Para poner a prueba esta hipótesis inicial se decidió realizar un escrutinio genético con la idea de encontrar nuevas dianas para SlrP que aportaran más información sobre su función y relevancia en el proceso de infección.

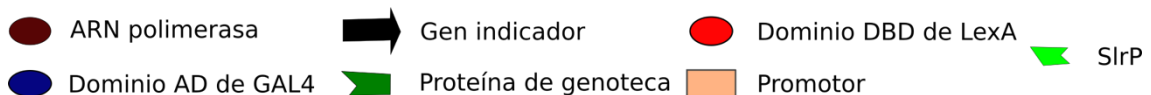
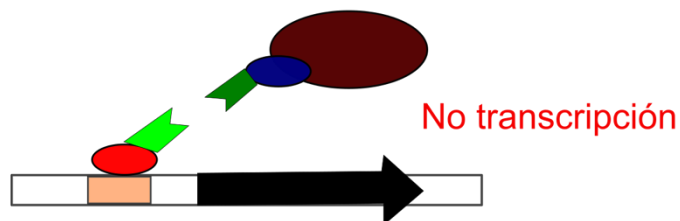
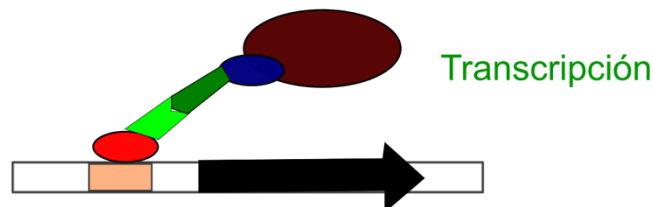
## 2.1 El sistema de doble híbrido en levaduras

El sistema que se utilizó para el escrutinio genético fue el de doble híbrido en levaduras. El sistema de doble híbrido es un ensayo para detectar interacción de proteínas *in vivo*, basado en un factor de transcripción que posee dos dominios separables: un dominio de unión al ADN (DBD, *DNA-binding domain*) y un dominio de activación de la transcripción (AD, *activation domain*). Cuando se estudia una interacción concreta entre dos proteínas, uno de los genes de interés se expresa como una fusión al DBD, mientras que el otro gen se expresa como una fusión al AD. Si se produce una interacción entre las proteínas cebo y presa, ocurrirá un acercamiento entre los dos dominios del factor de transcripción, complementando su actividad y permitiendo de esta manera la transcripción de un grupo de genes indicadores (**Figura R.2.1**).

### Unión normal del factor de transcripción al promotor y a la ARN polimerasa



### Ensayo de doble híbrido en levaduras



**Figura R.2.1. Esquema de la base del sistema de doble híbrido en levaduras.** En condiciones normales, la unión del factor de transcripción a la secuencia promotora adecuada activa la transcripción de un gen indicador. En el ensayo, la interacción entre SlrP y una proteína producto de la genoteca permite la reconstrucción del factor de transcripción y la expresión de dicho gen. Si la interacción no se produce, la reconstrucción no sucede y el gen indicador no se transcribe.

Cuando se quiere realizar un escrutinio, se fusiona la proteína de interés (llamada proteína “cebo”) al DBD y los productos de una genoteca de ADNc (que generarán muchas “proteínas presa” diferentes) se fusionan al AD. La tecnología de este sistema nos permite el acceso inmediato a genes que codifican proteínas que interactúan con la proteína de interés. Dado que *S. Typhimurium* es capaz de infectar a humanos, decidimos usar una genoteca de ADNc humano.

## 2.2 Descripción de genoteca, factor de transcripción, estirpe y plásmidos.

### 2.2.1. Genoteca

El escrutinio se realizó sobre una genoteca de ADNc, procedente de ARN poliadenilado de células Jurkat. Se trata de una línea celular humana que proviene de linfocitos. La genoteca fue construida en el plásmido pGAD1318 en fusión con la región activadora del factor de transcripción Gal4.

### 2.2.2. Factor de transcripción

Para el escrutinio genético se utilizó un factor de transcripción híbrido, en el cual encontramos el dominio de activación de Gal4 de la propia *S. cerevisiae* y el dominio de unión al ADN del factor bacteriano LexA. Ambos módulos se complementan para formar un factor de transcripción funcional en levaduras y pueden activar una serie de genes indicadores aguas abajo.

El DBD de LexA tiene propiedades diferentes al de Gal4, empleado en un escrutinio anterior (Bernal-Bayard and Ramos-Morales, 2009). Además, en este caso la fusión LexA se expresó desde un promotor completo, con lo que el nivel de expresión de la proteína cebo fue más elevado que el conseguido anteriormente. Todo esto hacía pensar que se pudieran detectar nuevas proteínas capaces de interactuar con SlrP.

### 2.2.3. Estirpe de *S. cerevisiae*.

El escrutinio se llevó a cabo usando la estirpe L40 de *S. cerevisiae*. Dicha estirpe tiene unas características que la hacen idónea para este estudio, ya que presenta una serie de requerimientos nutricionales necesarios para poder seleccionar los candidatos positivos del escrutinio y unos genes indicadores que se detallan a continuación:

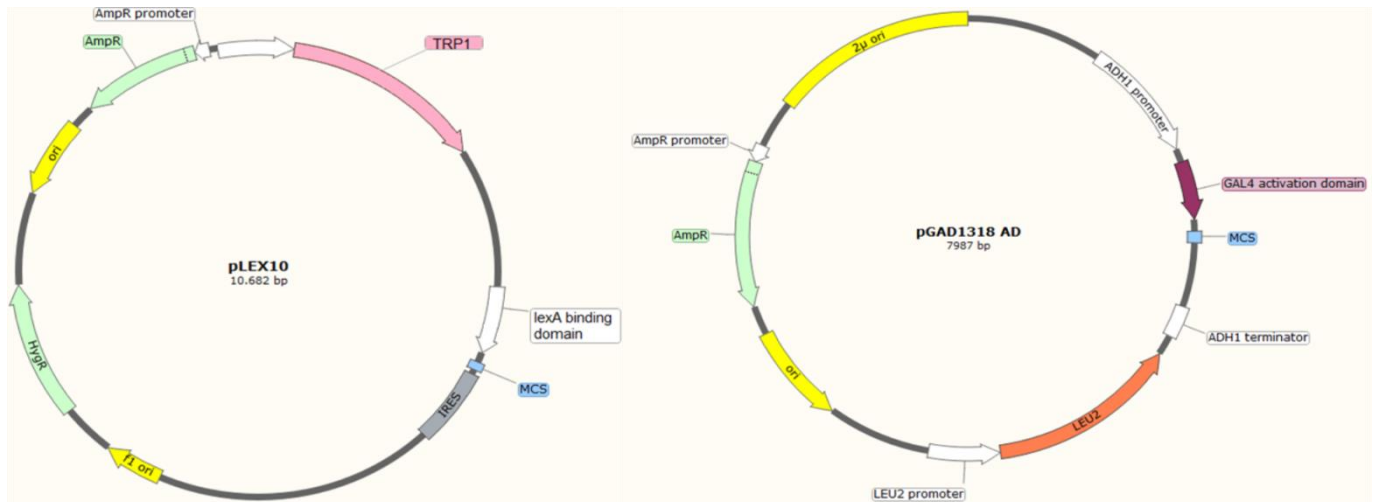
La estirpe L40 de *S. cerevisiae* posee las mutaciones *trp1* y *leu2*, las cuales convierten a esta levadura en auxótrofa para triptófano y leucina. Estos dos marcadores se usaron para seleccionar los transformantes de los plásmidos derivados de pLEX10 y pGAD1318, debido a que las mutaciones *trp1* y *leu2* se pueden complementar con los plásmidos pLEX10 y pGAD1318, respectivamente.

Además de las auxotrofías descritas anteriormente, la estirpe L40 también posee la mutación *his3*, que la convierte en auxótrofa para histidina. A su vez, cuenta con el sitio de reconocimiento del factor de transcripción LexA para regular la expresión del gen *HIS3* para complementar dicha auxotrofia, convirtiendo este gen en el primer gen reportero utilizado en el escrutinio. Esto quiere decir que se activará la expresión del gen *HIS3* cuando se reconstituya el factor de transcripción, fruto de una interacción entre SlrP y una proteína producto de la genoteca. Por tanto, podremos seleccionar los candidatos positivos de nuestro escrutinio usando un medio selectivo carente de histidina.

Por último, la estirpe L40 también tiene un segundo gen bajo el sitio de reconocimiento del factor de transcripción LexA: *lacZ*. El producto de este gen permite la degradación de X-Gal a galactosa y un subproducto insoluble de color azul. De este modo, para aumentar la robustez del escrutinio, también se estudiará la interacción entre proteínas del escrutinio mediante la realización de ensayos  $\beta$ -galactosidasa y el análisis de la activación del gen *lacZ*.

## 2.2.4 Plásmidos

Para la realización del escrutinio se utilizó el plásmido pIZ1628, un vector derivado de pLEX10 que contiene la secuencia codificante de *slrP*. Esta construcción se introdujo en la estirpe L40 de *S. cerevisiae* por transformación usando el procedimiento del acetato de litio (Sherman et al., 1987). La **Figura R2.2** muestra un esquema de los dos vectores empleados en este escrutinio, tanto del vector pLEX10 que porta el efector SlrP de *S. enterica* fusionado al dominio DBD del factor LexA, como del vector pGAD1318 en el que se construyó la genoteca.



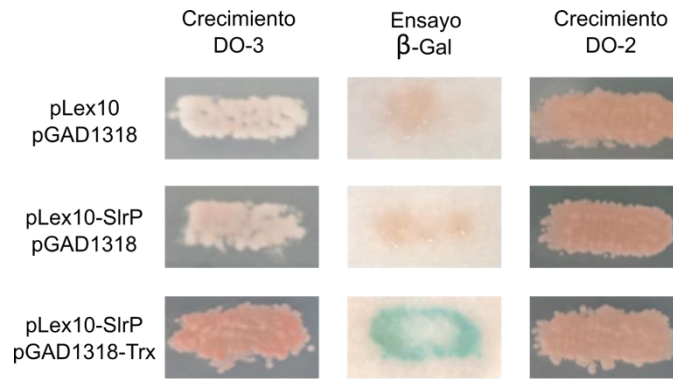
**Figura R.2.2. Esquemas de los vectores pLEX10 y pGAD1318.** En ambos vectores se indican los detalles fundamentales por los que son utilizados en este escrutinio: secuencia de resistencia a ampicilina para su selección en bacterias (verde); origen de replicación (amarillo); genes de complementación de auxotrofia TRP1 en pLEX10 (rosa) y LEU2 en pGAD1318 (naranja); sitio de clonación múltiple (MCS) para clonar el gen de interés (azul), tras el dominio LexA en pLEX10 y tras el dominio Gal4 en pGAD1318. Esquema realizado con el programa SnapGene Viewer.

## 2.3 Controles previos

En este tipo de ensayos, es esencial comprobar que la proteína cebo no produce transactivación de los genes indicadores. Es decir, es necesario corroborar que la fusión dominio DBD-SlrP no activa por sí sola la expresión de los genes indicadores. Para realizar esta prueba se transformó la estirpe L40/pLEX10-SlrP con el vector pGAD1318 vacío, sembrando en los medios selectivos  $DO^{-Trp-Leu}$  (en adelante denominado  $SD^{-2}$ ) y  $SD^{-Trp-Leu-His}$  (a partir de ahora denominado  $SD^{-3}$ ), además de hacer un ensayo de actividad  $\beta$ -galactosidasa. Como se observa en la **Figura R.2.3** no hay crecimiento en ausencia de histidina, ni actividad  $\beta$ -galactosidasa, por tanto, la expresión de la fusión DBD-SlrP por sí sola no activa la expresión de los genes indicadores *HIS3* y *lacZ* permitiéndonos así usar la fusión DB-SlrP como proteína cebo.

Además, incluimos otro control negativo y un control positivo. Respecto al primero, verificamos que la presencia de los dos plásmidos vacíos (pLEX10 y pGAD1318) no activaba la expresión de los genes marcadores. Este control también funcionó como se esperaba (**Figura R.2.3**). Como control positivo de que el sistema funciona correctamente se ensayó la interacción previamente descrita SlrP-TRX (Bernal-Bayard and Ramos-Morales, 2009). Como se observa en la última fila de la **Figura R2.2**, la interacción SlrP-TRX provoca la activación de los

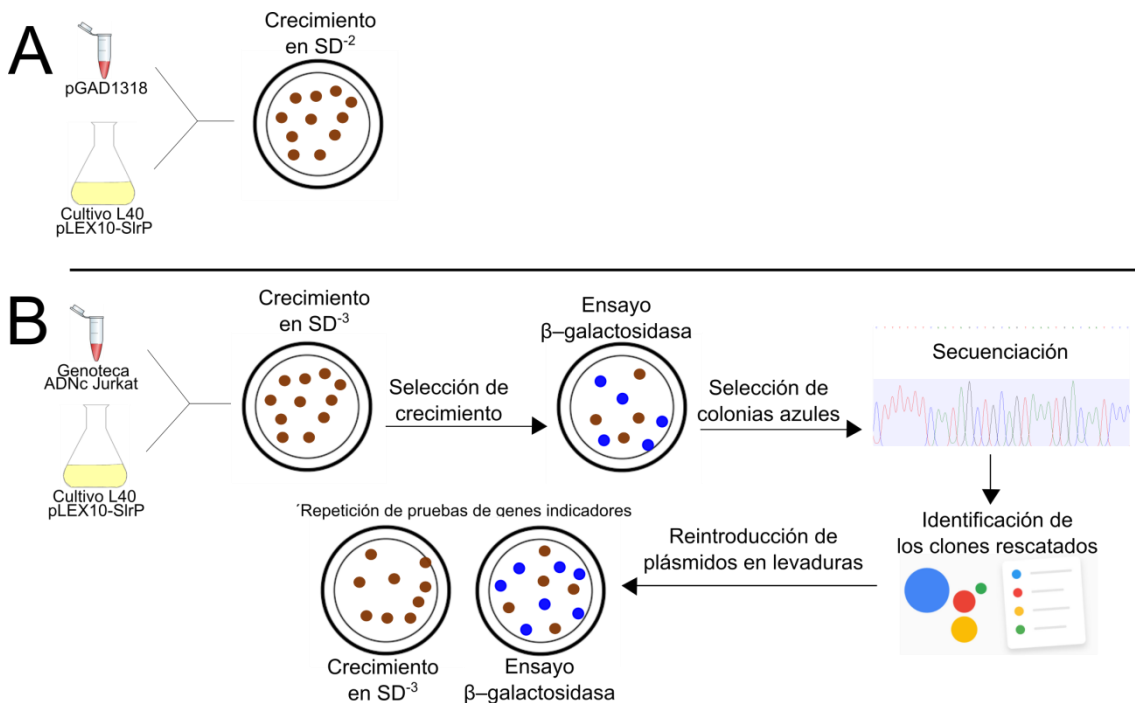
genes indicadores permitiendo el crecimiento de la levadura en un medio sin histidina y además exhibiendo color azul, como resultado de la actividad  $\beta$ -galactosidasa.



**Figura R.2.3. Controles previos del ensayo de doble híbrido.** Se transformó L40 con los vectores pLEX10 y pGAD1318 vacíos, o con pLEX10 con SlrP (proteína cebo) y el vector pGAD1318 vacío. La ausencia de crecimiento en medio  $SD^{-3}$  (carente de histidina, triptófano y leucina) y la ausencia de color azul en el ensayo de actividad  $\beta$ -galactosidasa indica que SlrP no produce transactivación de los genes indicadores y tampoco los vectores vacíos. Se utilizó la estirpe de L40 con los plásmidos pLEX10-SlrP y pGAD1318-TRX como control positivo de interacción. Todas las estirpes también crecieron en medio  $SD^{-2}$  (sin triptófano ni leucina) como control de la presencia de los dos vectores tras la transformación.

## 2.4 Escrutinio genético

El escrutinio se llevó a cabo según se muestra en el diagrama de la **Figura R.2.4**.



**Figura R.2.4. Esquema del procedimiento seguido en el escrutinio.** Se muestra un panel esquemático del proceso realizado para realizar el escrutinio, donde se diferencian: (A) prueba de eficiencia de transformación con vector pGAD1318; (B) escrutinio en L40 con la genoteca de ADNc de células Jurkat.

Antes de comenzar el escrutinio con la genoteca, se realizó una prueba de eficiencia de la transformación, para comprobar que el proceso se hace con una calidad suficiente. Como la genoteca es un material limitado y muy valioso, esta prueba de eficiencia se realizó transformando la estirpe L40/pLEX10-SlrP con el vector pGAD1318 (vector usado en la construcción de la genoteca). Se determinó, en base a las especificaciones de la genoteca y a trabajos realizados previamente en el laboratorio, que el sistema utilizado era eficiente si el número de transformantes superaba los  $10^6$  clones.

Una vez se confirmó la eficiencia del procedimiento, se transformó la estirpe L40/pLEX10-SlrP con la genoteca descrita anteriormente, y sembrando los transformantes en  $SD^{-3}$ . Una fracción de la transformación se sembró en medio selectivo con histidina para calcular el número de clones escrutados. Finalmente, el resultado fue de  $3 \times 10^6$  clones escrutados, de los que se obtuvieron 1400 clones capaces de crecer en medio  $SD^{-3}$ . De los 1400 clones que fueron capaces de crecer en  $SD^{-3}$ , 588 también dieron positivo en el ensayo de actividad  $\beta$ -galactosidasa.

Se rescataron los plásmidos de estos 588 clones que resultaron positivos para ambos marcadores. Estos clones fueron sometidos a ensayos de amplificación por PCR con cebadores específicos para el ADNc de tioredoxina (Trx1). La interacción entre Trx1 y SlrP está ampliamente descrita, por lo que era previsible encontrar Trx1 entre los candidatos obtenidos, lo que sería además una señal positiva de garantía del proceso. 220 candidatos de la genoteca fueron identificados como Trx1 por este método.

A continuación, del resto de clones se enviaron a secuenciar 14 candidatos aleatorios. Los resultados mostraron que la mayoría de ellos correspondían a los genes *SNRPD2* y *RAB1F*, por lo que de los clones restantes se descartaron las interacciones con los productos de estos mismos genes mediante PCR con oligonucleótidos específicos. Con sucesivas rondas de secuenciaciones de clones específicos para identificar genes y ensayos de PCR para descartar candidatos idénticos, se fueron identificando todos los clones. En la **Tabla R.2.1** se presenta un resumen de los resultados de este escrutinio.

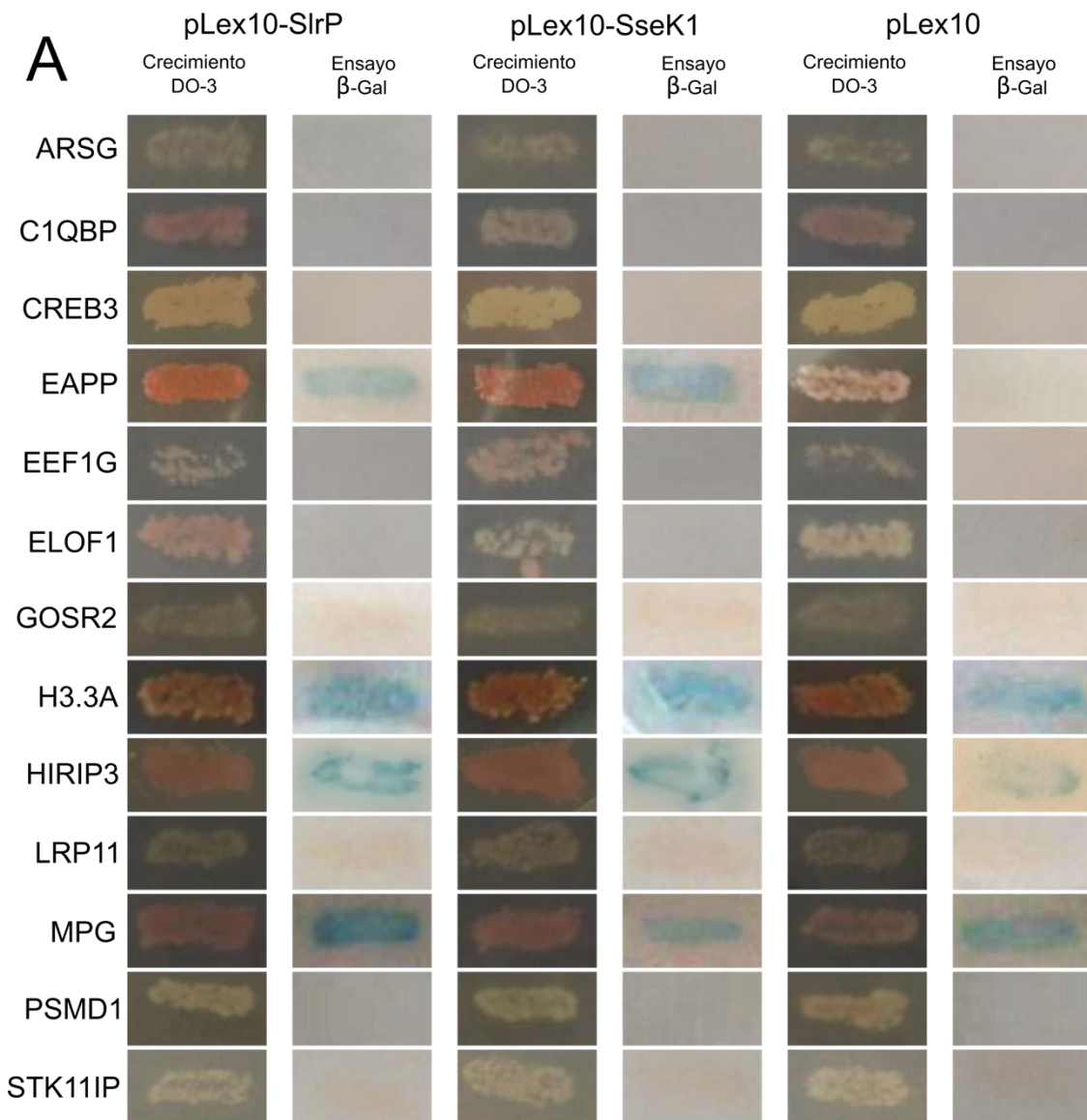
**Tabla R.2.1. Genes humanos identificados en el escrutinio de doble híbrido en levaduras con SlrP.**

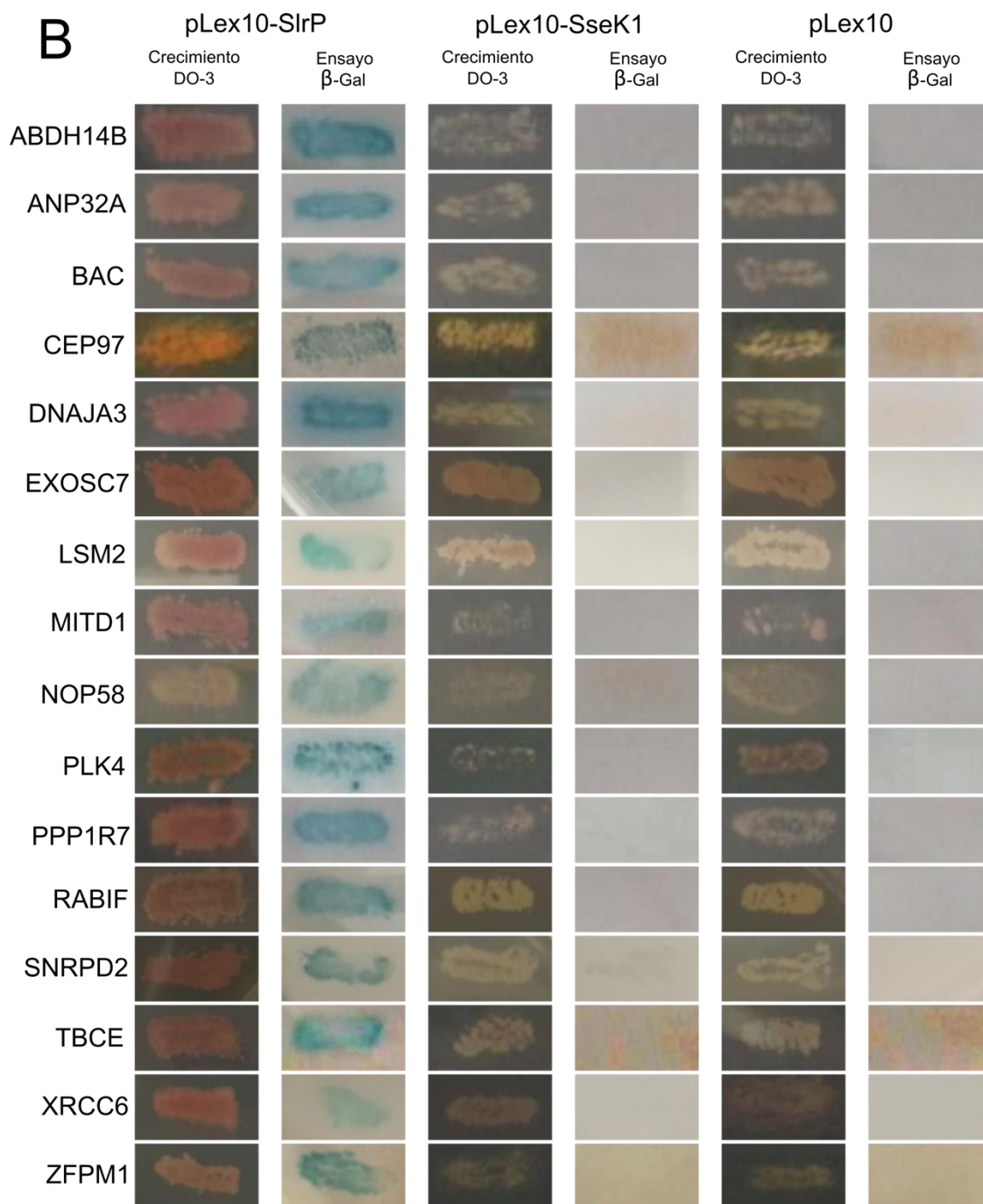
Gen	Número de candidatos	Descripción del producto	Aminoácidos incluidos
<b><i>SNRPD2</i></b>	236	<i>Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2</i>	1-118 10-118 13-118 15-118 19-118
<b><i>TRX</i></b>	220	<i>Thioredoxin</i>	1-105 2-105 5-105
<b><i>LSM2</i></b>	29	<i>U6 snDNA-associated Sm-like protein LSM2</i>	1-95 6-95
<b><i>PLK4</i></b>	11	<i>Serine/threonine protein kinase 4</i>	698-970 727-970 777-970 837-970



<b>MITD1</b>	9	<i>MIT (Microtubule Interacting and Trafficking) domain-containing protein 1</i>	1-249 8-249 72-249
<b>PPP1R7</b>	9	<i>Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7</i>	196-360 203-360
<b>RABIF</b>	8	<i>Guanine nucleotide exchange</i>	1-118 4-123
<b>XRCC6</b>	6	<i>X-Ray Cross-Complementing 6</i>	315-609 402-609 405-609 464-609
<b>ABHD14B</b>	5	<i>Abhydrolase domain-containing 14B</i>	1-210
<b>CEP97</b>	5	<i>Centrosomal protein 97</i>	120-865
<b>DNAJA3</b>	5	<i>DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member A3</i>	intrón
<b>EXOSC7</b>	4	<i>Exosome complex component RRP42</i>	40-291
<b>NOP58</b>	4	<i>Nucleolar protein 58</i>	360-529
<b>TBCE</b>	4	<i>Tubulin-folding cofactor E</i>	129-527
<b>MPG</b>	3	<i>DNA-3-methyladenine glycosylase</i>	1-293
<b>ZFPM1</b>	3	<i>Zinc Finger Protein Multitype 1</i>	893-1006
<b>ANP32A</b>	2	<i>Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A</i>	25-249
<b>BAC RP11-87C12</b>	2	Secuencia de vector de clonación	----
<b>CREB3</b>	2	<i>cAMP Responsive Element Binding Protein 3</i>	86-371
<b>ELOF1</b>	2	<i>Transcription elongation factor 1</i>	3'-UTR
<b>HIRIP3</b>	2	<i>HIRA Interacting Protein 3</i>	351-556 371-556
<b>ARSG</b>	1	<i>Arylsulfatase G</i>	1-73, stop por intrón
<b>C1QBP</b>	1	<i>Complement component 1Q binding protein</i>	19-282
<b>EAPP</b>	1	<i>E2F –associated phosphoprotein</i>	137-285
<b>EEF1G</b>	1	<i>Elongation Factor 1-Gamma</i>	284-437
<b>GOSR2</b>	1	<i>Golgi SNAP Receptor Complex Member 2</i>	3'-UTR
<b>H3.3A</b>	1	<i>Histone 3.3 isoform A</i>	30-136
<b>LRP11</b>	1	<i>LDL receptor related-protein 11</i>	3'-UTR
<b>PSMD1</b>	1	<i>26S Proteasome, non-ATPase regulatory subunit 1</i>	896-905, 3'UTR
<b>STK11IP</b>	1	<i>Serine/Threonine kinase 11 interacting protein</i>	686-1099
<b>UBA52</b>	1	<i>Ubiquitin 60S ribosomal protein L40</i>	98-128

Un clon de cada uno de los genes obtenidos en el escrutinio fue reintroducido en levaduras para confirmar el fenotipo observado. Se transformaron las estirpes L40/pLEX10, L40/pLEX10-SseK1 y L40/pLEX10-SlrP con cada clon para distinguir entre casos verdaderos de interacción y falsos positivos obtenidos, entre los que se incluyen proteínas de la genoteca capaces de interactuar con el dominio DBD del factor de transcripción o que tengan una interacción inespecífica con SlrP, lo cual se verá reflejado en una interacción con cualquier otra proteína, en este caso el efector SseK1. Las pruebas se realizaron analizando de nuevo los mismos genes indicadores: crecimiento en medio selectivo sin histidina y ensayo de actividad  $\beta$ -galactosidasa, obteniéndose los resultados que se reflejan en la **Figura R.2.5**.





**Figura R.2.5. Análisis de las interacciones de SlrP con proteínas humanas mediante el sistema de doble híbrido en levaduras.** Se muestra el crecimiento en medio selectivo SD<sup>-3</sup> (sin histidina, triptófano ni leucina) y la actividad  $\beta$ -galactosidasa de un candidato de cada uno de los genes obtenidos en el escrutinio. Se realizaron los ensayos de los candidatos también frente a los vectores pLEX10 como control negativo y pLEX10-SseK1 como control de la especificidad de la interacción. A: candidatos invalidados tras no superar alguno de los ensayos o superarlos de forma inespecífica. B: candidatos confirmados que superaron los ensayos tras una interacción específica con SlrP.

En la **Figura R.2.5** se puede observar que aproximadamente la mitad de los candidatos del escrutinio quedaron descartados tras volver a ensayar su interacción con SlrP en levaduras. Para los productos de los genes *EAPP*, *H3.3A*, *HIRIP3* y *MPG* se detectó que la interacción que tenían con SlrP era inespecífica, ya que se observó activación de los genes indicadores al probarlos con SseK1 e incluso con el vector vacío. En el resto de los casos descartados, el resultado del ensayo de interacción fue negativo.

De los candidatos en los que se confirmó la interacción con SlrP, se saca del estudio el candidato *DNAJA3*, ya que como se muestra en la **Tabla R.2.1**, la secuencia del candidato corresponde a un intrón, de modo que el producto resultante no corresponde a una proteína real. También se sacó del estudio el candidato *BAC RP11-87C12*, dado que es una secuencia artificial de un vector de clonación. Del resto de candidatos, se muestran en la siguiente tabla más datos y referencias:

**Tabla R.2.2: Análisis de ontología génica de los candidatos obtenidos en el escrutinio de doble híbrido con SlrP.**

Gen	Función	Proceso	Localización
<b>ABHD14B</b>	-Hidrolasa de serina (Padmanabhan et al., 2003) -Desacetilasa de lisina (Rajendran et al., 2020)	-Iniciación de la transcripción (Padmanabhan et al., 2003) -Control de la producción de acetil-CoA (Rajendran et al., 2020)	-Citoplasma (Long and Cravatt, 2011) -Nuclear
<b>ANP32A</b>	-Unión a colas de histonas (Seo et al., 2001) -Reclutado por factores de transcripción (Cvetanovic et al., 2007)	-Bloqueo de acetilación de histonas (Seo et al., 2001) -Regulación de la transcripción (Cvetanovic et al., 2007)	-Nuclear (Kadkol et al., 1998) -Citoplasma (Martinaulet et al., 2005) -Superficie celular (Callebaut et al., 1998) -Secreción (Chang et al., 2010)
<b>CEP97</b>	-Interacción con proteínas del centrosoma (Spektor et al., 2007)	-Inhibición de la formación del cilio primario (Spektor et al., 2007) -Regulación de la estabilidad del centriolo (Spektor et al., 2007)	-Citoplasma
<b>EXOSC7</b>	-Subunidad del exosoma (Raijmakers et al., 2002)	-Metabolismo del ARN (Raijmakers et al., 2002)	-Citoplasma (Anderson and Parker, 1998) -Núcleo (Bousquet-Antonelli et al., 2000)
<b>LSM2</b>	-Subunidad de un complejo de unión a ARN (Coller and Parker, 2004)	-Procesamiento de ARNm (Coller and Parker, 2004)	-Núcleo (Coller and Parker, 2004)
<b>MITD1</b>	-Interacción con ESCRT-III (Lee et al., 2012a) -Actividad fosfolipasa tipo D (Hadders et al., 2012)	-Citoquinesis (Lee et al., 2012a)	-Citoplasma
<b>NOP58</b>	-Interacción con importina $\alpha$ (Lyman et al., 1999)	-Procesamiento de ARN ribosómico (Filipowicz and Pogači, 2002)	-Núcleo

<b>PLK4</b>	-Quinasa de serina/treonina (Habedanck et al., 2005)	-Regulación de la duplicación del centriolo (Habedanck et al., 2005)	-Citoplasma
<b>PPP1R7</b>	-Regulación de PP1 (Renouf et al., 1995)	-Regulación positiva de la defosforilación de proteínas (Wurzenberger et al., 2012)	-Núcleo
<b>RAB1F</b>	-Interacción con GTPasas de la proteína Rab (Burton et al., 1994) -Interacción con integrina $\alpha$ (Burton et al., 1994)	-Intercambiador de nucleótidos de guanina (Burton et al., 1994) -Chaperona de la proteína Rab (Wixler et al., 2011) -Regulador de respuesta a estrés (Walter et al., 2012) -Regulador de apoptosis (Walter et al., 2012)	-Citoplasma
<b>SNRPD2</b>	-Subunidad de un complejo de ribonucleoproteínas (Lehmeier et al., 1994)	-Splicing (Lehmeier et al., 1994)	-Nuclear
<b>TBCE</b>	-Asociación con $\alpha$ -tubulina (Tian et al., 1996) -Interacción con TBCB (Kortazar et al., 2007)	-Síntesis de microtúbulos (Tian et al., 1996) -Disociación de heterodímeros de tubulina (Bhamidipati et al., 2000) -Dinámica de microtúbulos (Bhamidipati et al., 2000) -Transporte axonal de tubulina (Schaefer et al., 2007)	-Citoplasma -Microtúbulos (Tian et al., 1996) -Golgi (Schaefer et al., 2007)
<b>XRCC6</b>	-Unión a ADN dañado (Tuteja et al., 1994) -Unión a ADN de doble cadena (Tuteja et al., 1994) -Actividad fosfato liasa (Roberts et al., 2010)	-Desenrollamiento de ADN (Tuteja et al., 1994) -Ligación de ADN (Baumann and West, 1998) -Respuesta celular a rayos X -Reparación de ADN mediante recombinación no homóloga (Baumann and West, 1998)	-Núcleo (Goedecke et al., 1999)
<b>ZFPM1</b>	-Interacción con el factor GATA (Fox et al., 1999) -Reclutamiento de otros factores de transcripción (Hong et al., 2005)	-Regulación transcripcional (Hong et al., 2005) -Regulación de la remodelación de nucleosomas (Hong et al., 2005) -Regulación hematopoyesis (Gregory et al., 2010)	-Núcleo

## 2.5 Ensayo de ubiquitilación de SlrP sobre los candidatos del escrutinio genético

Como se ha indicado anteriormente, SlrP es una ligasa de ubiquitina. Una vez se obtuvo una relación de candidatos para los que se confirmó su interacción con SlrP, se ensayó si el efector de *Salmonella* ejercía su actividad enzimática sobre algunos de ellos, mediante experimentos de ubiquitilación *in vitro*.

La reacción de ubiquitilación es un proceso en el que participan secuencialmente tres enzimas: E1, que es una enzima activadora de la ubiquitina; E2, que produce la conjugación con la ubiquitina activada; y E3, que es la enzima ligasa que une la ubiquitina covalentemente al sustrato. SlrP ejerce como enzima E3, y por tanto en la reacción *in vitro* se añaden este efector

como componente E3, junto con el resto de componentes necesarios: HA-ubiquitina, E1, E2 y los candidatos a sustratos de la actividad ligasa de ubiquitina de SlrP. Se empleó ubiquitina etiquetada con HA para facilitar su reconocimiento con un anticuerpo comercial anti-HA en experimentos posteriores.

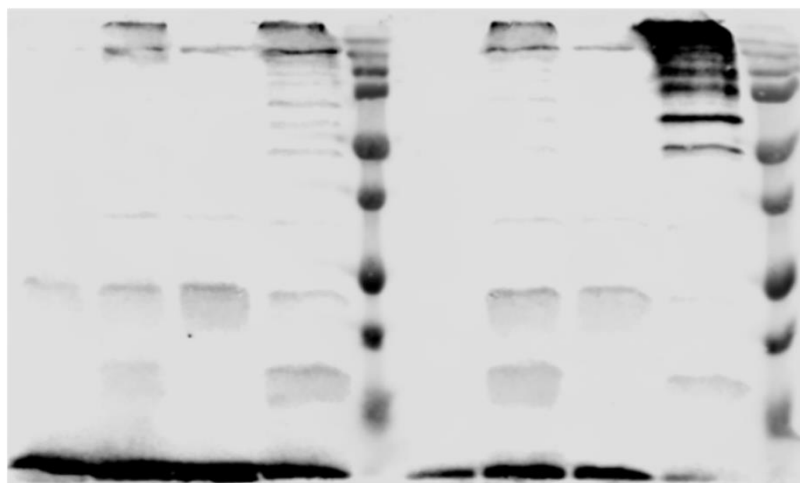
Se decidió realizar este ensayo *in vitro*, de entre todos los candidatos, con aquellos cuya interacción con SlrP era aparentemente más fiable. Se determinó dicha fiabilidad en función del número de veces que un candidato fuera obtenido en el escrutinio, y además por la aparición de más de un clon diferente del mismo candidato. Por ello, se seleccionaron finalmente los candidatos SNRPD2, LSM2, PLK4, MITD1, PPP1R7 y RABIF. Aunque el candidato XRCC6 cumplía con los requisitos para continuar trabajando con él, el hecho de que hubiera aparecido también en otros escrutinios realizados en el laboratorio nos hizo pensar que pudiera también tratarse de un falso positivo.

Tanto el efector SlrP como los posibles sustratos de su actividad ligasa de ubiquitina, se produjeron en fusión con la proteína GST, para posteriormente purificarlos utilizando una matriz de glutatión-agarosa. Esto se pudo hacer gracias al uso de las diferentes variantes del vector pGEX:

- pGEX-4T-3 → utilizado en el laboratorio anteriormente para construir la fusión de SlrP bajo la proteína GST, generando el plásmido pIZ1623.
- pGEX-4T-2 → utilizado en este trabajo para incorporar directamente el gen desde su clon correspondiente de la genoteca, mediante el uso de enzimas de restricción. Así se construyeron las fusiones de SNRPD2, LSM2, PLK4, MITD1, PPP1R7 y RABIF bajo la proteína GST, generando los plásmidos pIZ3403, pIZ3495, pIZ3400, pIZ3399, pIZ3401 y pIZ3402, respectivamente

Una vez purificadas todas las proteínas, se realizó el ensayo *in vitro*. El resultado de las reacciones se analizó mediante *western blot* utilizando anticuerpos anti-HA, para detectar el marcaje de la ubiquitina etiquetada con el epitopo HA. En la **Figura R.2.6** se puede observar el resultado de la reacción *in vitro* para uno de los candidatos (SNRPD2) y de TRX, que es un sustrato control positivo de la actividad enzimática de SlrP.

Tampón reacción	-	+	+	+	-	+	+	+
Tampón sin E1/E2	+	-	-	-	+	-	-	-
GST-SlrP	+	+	-	+	+	+	-	+
GST-TRX	+	-	+	+	-	-	-	-
GST-SNRPD2	-	-	-	-	+	-	+	+

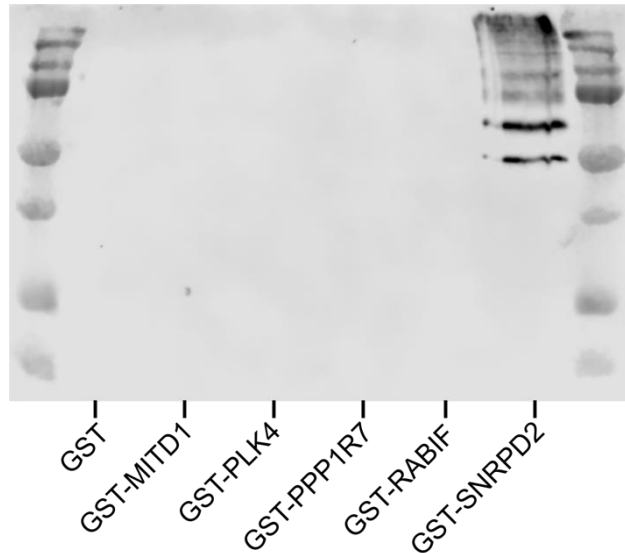


**Figura R.2.6. Ensayo de ubiquitilación *in vitro* de SNRPD2 y TRX.** Reacciones de ubiquitilación *in vitro* realizadas en presencia de HA-ubiquitina, E1, E2, GST-SlrP, GST-TRX y GST-SNRPD2. Se muestra el análisis mediante *western blot* utilizando anticuerpos monoclonales anti-HA. Se añaden tres reacciones como control negativo en cada caso: una reacción con tampón que no incluye E1 ni E2; una reacción sin GST-SlrP; y por último una reacción sin el sustrato (GST-TRX o GST-SNRPD2).

Tal y como se puede observar en la **Figura R.2.6**, el marcaje de la ubiquitina en la reacción de ubiquitilación de SNRPD2 es muy pronunciado, lo cual sugiere que efectivamente es un sustrato de la actividad ligasa de ubiquitina de SlrP. Sin embargo, en las reacciones *in vitro* en las que falta algún componente y se utilizaron como control negativo (como las reacciones con ausencia de GST-SlrP, GST-TRX o GST-SNRPD2) también aparece un ligero marcaje, aparentemente inespecífico.

Para verificar la especificidad de la ubiquitilación de SlrP sobre SNRPD2 se incluyó un control que consistió en modificar ligeramente la estrategia del experimento.

Se rehicieron los ensayos de ubiquitilación *in vitro* utilizando en este caso el efector en forma de 6His-SlrP, mientras que se mantuvo la fusión de los posibles sustratos con la proteína GST. Este cambio permitió que, tras la reacción *in vitro*, se pudieran purificar por afinidad los candidatos utilizando una matriz de agarosa con glutatión y mediante lavados posteriores se pudieran descartar el resto de componentes de la reacción. El resultado de esta variación se muestra en la **Figura R.2.7**.



**Figura R.2.7. Ensayo de ubiquitilación *in vitro* y purificación por afinidad de los posibles sustratos de la actividad enzimática de SlrP.** Las reacciones de ubiquitilación *in vitro* se realizaron con HA-ubiquitina, E1, E2, 6His-SlrP y las proteínas humanas candidatas MITD1, PLK4, PPP1R7, RABIF y SNRPD2 (producidas en fusión con la proteína GST). Tras la reacción, las proteínas humanas se purificaron con una matriz de agarosa con glutatión y se analizó su posible ubiquitilación mediante *western blot* utilizando anticuerpos monoclonales anti-HA.

Utilizando esta variante de la reacción *in vitro*, se obtiene un resultado mucho más limpio (**Figura R.2.7**) y se puede observar con claridad que SNRPD2, tal y como se intuía en la **Figura R.2.6**, es ubiquitilado por SlrP, mientras que con el resto de candidatos del escrutinio no se observa modificación alguna.

En conclusión, los datos mostrados en este capítulo sugieren que SlrP podría interactuar con varias proteínas del hospedador y que al menos una de ellas, SNRPD2, se comportaría como un sustrato de su actividad ligasa de ubiquitina.



## **Capítulo 3**

# **Efecto global de SlrP en el transcriptoma de la célula hospedadora**

---



En nuestro laboratorio se ha trabajado ampliamente con el efector SlrP en diferentes proyectos. Por ejemplo, se ha realizado un estudio fenotípico del efecto de la expresión de *slrP* en una línea de células HeLa transfectada de manera estable (Bernal-Bayard and Ramos-Morales, 2009). Mediante el uso de estas mismas transfecciones estables, también se ha estudiado el efecto de SlrP en la célula hospedadora a nivel proteómico (Cordero-Alba et al., 2016) y a nivel transcriptómico (Tesis Doctoral de la Dra. Cordero Alba). Cada uno de esos trabajos ha contribuido a un mejor conocimiento de la proteína efectora SlrP y el efecto de su expresión en la célula hospedadora.

En el tercer capítulo de esta Tesis, se pretende dar un paso más en el entendimiento sobre el papel biológico del efector SlrP de *Salmonella* en el contexto de la infección por dicha bacteria patógena. Los estudios anteriores están basados en el efecto de la expresión heteróloga de una proteína bacteriana en una línea celular humana. Aunque estos estudios son muy valiosos y aportan mucha información sobre la posible función de una determinada proteína, no nos ofrecen una referencia clara sobre lo que ocurriría en un escenario más fisiológico como el de una infección. Con el objetivo de estudiar el papel específico de SlrP dentro del contexto de la infección del hospedador por parte de *S. enterica* llevamos a cabo un análisis transcriptómico de células HeLa infectadas con la versión silvestre del patógeno y lo comparamos con células infectadas con un mutante con expresión nula de *slrP*.

### **3.1 Condiciones experimentales para hacer el *microarray***

El objetivo primordial de este estudio es describir el efecto que tiene la presencia de la proteína efectora SlrP en células humanas de la forma más cercana posible a la realidad fisiológica. De modo que la primera pregunta que nos hicimos fue: ¿cuál es la forma en la que naturalmente entran en contacto el efector y las células hospedadoras? La respuesta fue clara: en el transcurso de una infección por *Salmonella*, la bacteria es capaz de translocar este y otros efectores al hospedador a través de los T3SS-1 y T3SS-2. El T3SS empleado depende de varios factores, entre ellos, del tipo celular del hospedador y el tiempo de infección (Cordero-Alba and Ramos-Morales, 2014).

Para este análisis, se llevaron a cabo infecciones de células HeLa con la estirpe silvestre 14028 de *S. Typhimurium* y, en paralelo, se infectaron las células HeLa con la estirpe 14028 mutante con una deleción en el gen *slrP* ( $\Delta slrP$ ). De este modo, la única diferencia entre las dos muestras sería la presencia o ausencia de SlrP, mientras que el resto de procesos que suceden durante la infección siguen ocurriendo exactamente igual. Para cada uno de los casos se realizaron tres experimentos independientes de cultivos infectados durante 8 horas con un MOI de 50:1, condiciones en las que se asegura la infección de *Salmonella* con una translocación óptima del efector SlrP a la célula hospedadora. Tras el proceso de infección, se extrajo el ARN total de los cultivos celulares y se analizaron utilizando el *microarray GeneChip Human Gene 1.0 ST array* (Affymetrix), el cual es capaz de analizar 29096 identificadores de genes humanos.

### 3.2 Obtención de datos del *microarray* y descripción de los genes

A través del programa *Transcriptome Analysis Console* (Affymetrix) se pudieron organizar todos los datos generados para realizar el análisis. Para considerar que un gen tenía una expresión diferencial entre las muestras, debía cumplir los siguientes criterios:

- Que la diferencia de expresión entre ambos grupos sea estadísticamente significativa, con un valor  $p < 0.05$
- Que la variación de expresión de un gen entre diferentes grupos (denominado *M* o *fold change*) tenga un valor absoluto de 1.6, es decir, +1.6 en el caso de un incremento en la expresión de genes y -1.6 cuando se reprime la expresión de genes.

De este modo, una vez realizada la comparación entre la transcriptómica de las diferentes muestras, se pudo identificar un conjunto de 15 genes (**Tabla R.3.1**) para los que se encontraba una expresión diferencial entre los valores obtenidos en la infección con *Salmonella* silvestre y la infección con el mutante  $\Delta$ *SlrP*.

**Tabla R.3.1. Genes con expresión diferencial en presencia de SlrP en infecciones de células HeLa.**

	Gen	Descripción	Fold Change (lineal)	ANOVA p-value
Genes activados	<i>RBMY1B</i>	<i>RNA binding motif protein, Y-linked, family 1, member B</i>	3.22	0.0000257
	<i>IGKV2D-29</i>	<i>immunoglobulin kappa variable 2D-29</i>	2.08	0.0026
	<i>PPIAP</i>	<i>peptidylpropyl isomerase A (PPIA) pseudogene</i>	1.79	0.0019
	<i>FMN1</i>	<i>formin 1</i>	1.77	0.0418
	<i>PLA2G10</i>	<i>phospholipase A2, group X</i>	1.74	0.0172
	<i>PPP1R2P</i>	<i>protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2 (PPP1R2) pseudogene</i>	1.72	0.008
	<i>SFPQ</i>	<i>splicing factor proline/glutamine-rich</i>	1.6	0.0356
Genes reprimidos	<i>BHLHA9</i>	<i>basic helix-loop-helix family, member a9</i>	-1.63	0.0072
	<i>USP32P1</i>	<i>ubiquitin specific peptidase 32 pseudogene 1</i>	-1.63	0.0006
	<i>HSPA7</i>	<i>heat shock 70kDa protein 7 (HSP70B)</i>	-1.63	0.0082
	<i>HBZ</i>	<i>Hemoglobin subunit zeta</i>	-1.68	0.0209
	<i>ANP32A-IT1</i>	<i>ANP32A intronic transcript 1</i>	-1.7	0.0204
	<i>LSP1</i>	<i>lymphocyte-specific protein 1</i>	-1.76	0.024

<b>Genes reprimidos</b>	<i>FAM231B</i>	<i>family with sequence similarity 231, member B</i>	-1.97	0.0053
	<i>FAM231ABC</i>	<i>family with sequence similarity 231, member A, B, and C</i>	-2.04	0.0011

Se muestran el valor de p y el cambio lineal de la expresión (FC, *fold change*).

Se utilizó la base de datos *Gene* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) para encontrar una descripción de cada uno de los genes con expresión diferencial. Además, se combinó la información obtenida con una segunda base de datos, *The Human Protein Atlas* (Uhlen et al., 2017), en la que se puede encontrar si la expresión es característica de algún tejido u órgano en particular, debido a su integración de diferentes trabajos que implican tecnologías ómicas. Todos los datos obtenidos se reflejan en la **Tabla R.3.2**. Es necesario aclarar que para los pseudogenes *USP32P1*, *PPP1R2P* y *PPIAP* se describe la información encontrada para los genes *USP32*, *PPP1R2* y *PPIA*, respectivamente, ya que son los genes originales de los que derivan los transcritos encontrados en el *microarray*.

**Tabla R.3.2. Descripción de los genes con expresión diferencial en presencia de SlrP en infecciones.** También se anota, en los casos en los que hay información disponible, la expresión específica del producto del gen. Descripciones obtenidas con las bases de datos *Gene* y *The Human Protein Atlas*.

	Gen	Descripción
<b>Genes activados</b>	<b><i>RBMY1B</i></b>	Codifica una proteína de unión a ARN implicada en el proceso de <i>splicing</i> durante la espermatogénesis. Tiene expresión específica de tejido, en testículos.
	<b><i>IGKV2D-29</i></b>	Inmunoglobulina implicada en la respuesta inmune del organismo.
	<b><i>PPIA</i></b>	Forma parte de la familia de las peptidilprolil isomerasas, que se unen a oligopéptidos y aceleran el plegamiento de las proteínas. El producto de este gen interactúa con la ciclosporina y varias proteínas del VIH.
	<b><i>FMN1</i></b>	Codifica una proteína implicada en la formación de uniones adherentes y en la polimerización de fibras lineales de actina. Tiene una expresión muy generalizada en varios tejidos, entre ellos el aparato digestivo (estómago y colon).
	<b><i>PLA2G10</i></b>	Es un miembro de la familia de las proteínas fosfolipasas A2. Cataliza la liberación de ácidos grasos a partir de fosfolípidos, y está implicada en diferentes funciones fisiológicas. Tiene una expresión específica en el aparato digestivo (estómago e intestinos).
	<b><i>PPP1R2</i></b>	El producto de este gen se une a la subunidad catalítica de la fosfatasa de serina y treonina PP1, inhibiendo su actividad.
	<b><i>SFPQ</i></b>	El producto de este gen es una proteína de unión a ácidos nucleicos, implicada en varios procesos en relación con la información contenida en el núcleo, como <i>splicing</i> o regulación de expresión de genes.
<b>Genes reprimidos</b>	<b><i>BHLHA9</i></b>	Forma parte de una familia de genes que dan lugar a proteínas con una característica región de dos hélices separadas por un dominio de lazo. Codifica un factor de transcripción. Su expresión está regulada temporalmente, ya que interviene en el desarrollo embrionario de las extremidades.
	<b><i>USP32</i></b>	Este gen codifica una peptidasa específica de ubiquitina, y se localiza en el Golgi de la célula. Tiene una expresión extendida por numerosos tejidos y es un marcador de ciertos tipos de cánceres
	<b><i>HSPA7</i></b>	Codifica las proteínas de respuesta a diferentes tipos de estrés sufrido

<b>Genes reprimidos</b>		por la célula. Participa en la conservación de proteínas desnaturalizadas por el estrés, gracias a que facilita su plegamiento.
	<b><i>HBZ</i></b>	Codifica una proteína de tipo $\alpha$ -hemoglobulina. Su expresión está regulada temporalmente, ya que se sintetiza en el saco vitelino del embrión temprano.
	<b><i>ANP32A</i></b>	El producto de este gen es una proteína implicada en diferentes procesos relacionados con la muerte celular, el ciclo celular y la regulación de la transcripción.
	<b><i>LSP1</i></b>	Este gen codifica una proteína de unión a actina F. Se expresa en diferentes tipos celulares relacionados con la inmunidad.
	<b><i>FAM231ABC</i></b>	Las proteínas codificadas por los genes que forman parte de esta familia no tienen una función específica asociada hasta el momento.

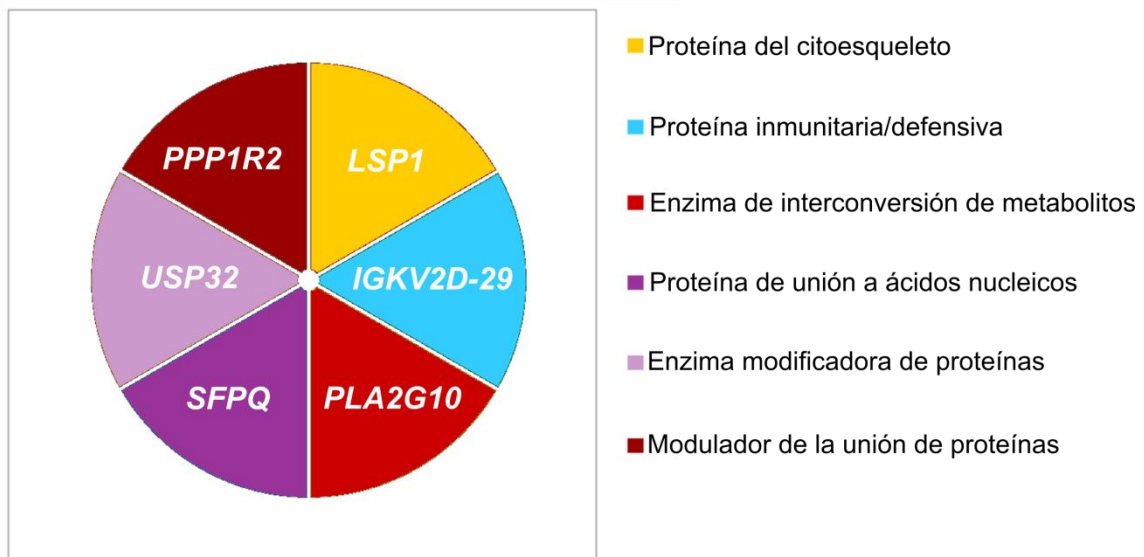
El hecho de que se obtuvieran diferencias a nivel transcripcional de estos genes no significa que todos ellos tengan verdaderamente un papel relevante en el proceso de infección de *Salmonella* en general, ni en la función de SlrP en particular. Como se puede comprobar en la tabla anterior, algunos de los genes identificados no parecen tener una relación relevante en un contexto de infección por *Salmonella*, por lo que se optó por centrar el estudio en otros candidatos que parecían más interesantes.

Los genes que se excluyeron fueron *ANP32A-IT1*, debido a que se trata de un ARN no codificante, y aquellos en los que su expresión los aleja de ser relevantes en una infección; *RBMY1B*, ya que como se puede observar en la información aportada justo después, es un gen de expresión específica en testículos; y los genes *BHLHA9* y *HBZ*, ya que su expresión se restringe temporalmente a las primeras etapas del desarrollo del embrión. Por último, la falta de información de los genes *FAM231ABC* también causó su salida del estudio.

### 3.3 Análisis de ontología génica

Con los datos obtenidos en el *microarray* y la descripción anterior, se ha realizado una búsqueda más exhaustiva desde diferentes puntos de vista para aportar información sobre qué implicaciones e importancia tienen estos genes que varían su expresión dependiendo de la presencia o no de SlrP.

Para ello, se hizo uso de la herramienta *Gene Ontology Consortium* (<http://geneontology.org/>), que nos muestra diagramas en los que se reflejan diferentes aspectos que se han descrito para estos genes. En la **Figura R.3.1** se muestra, como reflejo de uno de los tipos de información que se proporciona, la clase de proteínas que codifican los genes en nuestro análisis.



**Figura R.3.1.** Clases de proteínas codificadas por los genes con expresión diferencial en presencia de SlrP durante la infección de células HeLa. Obtenidos con la herramienta *Gene Ontology*.

En la **Figura R.3.1** se puede apreciar de forma rápida que la información disponible de cada gen codifica proteínas de diferentes clases. El aspecto negativo de la herramienta *Gene Ontology* es que no pudo arrojarnos en este sentido ningún resultado más acerca de la clasificación de proteínas que codifican los genes *FMN1*, *HSPA7* y *PPIA*. A pesar de ello, hemos extraído mucha información a partir de esta herramienta desde otras perspectivas: función molecular de los productos de los genes, componente o localización celular y procesos biológicos en los que se encuentran implicados. Debido a que las entradas son múltiples para cada uno de los genes, la representación en diagramas puede resultar confusa, por lo que hemos decidido resumir los datos en la **Tabla R.3.3**.

**Tabla R.3.3.** Análisis de ontología génica de los genes con expresión diferencial en presencia de SlrP durante la infección de células HeLa. Obtenido con la herramienta *Gene Ontology*.

Gen*	Componente celular	Función molecular	Proceso Biológico
<i>FMN1</i>	-Membrana plasmática -Membrana del retículo endoplásmico -Endosomas -Núcleo	-Unión a microtúbulos -Unión a actina	-Generación de filamentos de actina -Adhesión focal -Morfogénesis
<i>HSPA7</i>	-Membrana plasmática -Citoplasma -Núcleo	-Unión a proteínas desplegadas -Unión a ligasas de ubiquitina -Unión a ATP -Actividad ATPasa -Unión a proteínas de choque térmico	-Plegamiento de proteínas mediado por chaperonas -Transporte mediado por vesículas -Respuesta celular a proteínas no plegadas
<i>IGKV2D-29</i>	-Complejo de inmunoglobulinas -Espacio extracelular	_____	-Respuesta inmune -Respuesta adaptativa -Producción de inmunoglobulinas

<b>LSP1</b>	-Citoesqueleto -Membrana plasmática -Espacio extracelular	-Unión a actina	-Respuesta defensiva celular -Transducción de señales
<b>PLA2G10</b>	-Espacio extracelular -Lisosomas	-Unión a Ca <sup>2+</sup> -Unión a fosfolípidos -Actividad fosfolipasa dependiente de Ca <sup>2</sup>	-Respuesta frente a virus -Homeostasis del colesterol -Regulación del metabolismo de fosfolípidos -Transporte de fosfolípidos -Remodelado de lipoproteínas LDL
<b>PPIA</b>	-Citosol	-Actividad isomerasa -Unión a proteínas desplegadas -Unión a fármacos -Unión a ARN	-Plegamiento de proteínas -Respuesta celular a estrés oxidativo -Regulación de vías de señalización de apoptosis
<b>PPP1R2</b>	-Centrosoma	-Unión a fosfatasa de proteínas -Inhibidor de actividad fosfatasa -Fosfatasa de proteínas	-Generación de metabolitos precursores y energía -Regulación de la actividad de fosfatasas
<b>SFPQ</b>	-Núcleo	-Unión a ácidos nucleicos: ARN y ADN -Unión a cromatina -Desacetilasa de histonas	-Regulación de la transcripción -Procesado de ARNm - <i>Splicing</i> -Activación de la respuesta inmune -Reparación de roturas de doble cadena en el ADN -Activación de la respuesta apoptótica a estrés oxidativo
<b>USP32</b>	-Golgi -Citosol	-Peptidasa de cisteínas -Proteasa de ubiquitina dependiente de tior -Unión a Ca <sup>2+</sup>	-Desubcutilación de proteínas -Catabolismo dependiente de ubiquitilación.

\*Código de color. Verde: expresión activada. Rojo: expresión reprimida.

### 3.4 Análisis de rutas e interacciones de los genes identificados

Por último, pretendemos aportar información desde otro punto de vista acerca de los genes identificados: en qué rutas específicas están implicados y las interacciones que se producen entre los productos de estos genes y otras proteínas.

#### 3.4.1 Rutas y vías de señalización

Se empleó de nuevo el programa *Transcriptome Analysis Console* de Affymetrix, que ofrece un listado de las rutas en las que el producto de cada uno de estos genes interviene. Estas rutas se confirmaron también consultando las bases de datos *Genecards* y *Reactome*, obteniendo los resultados que figuran en la **Tabla R.3.4**:



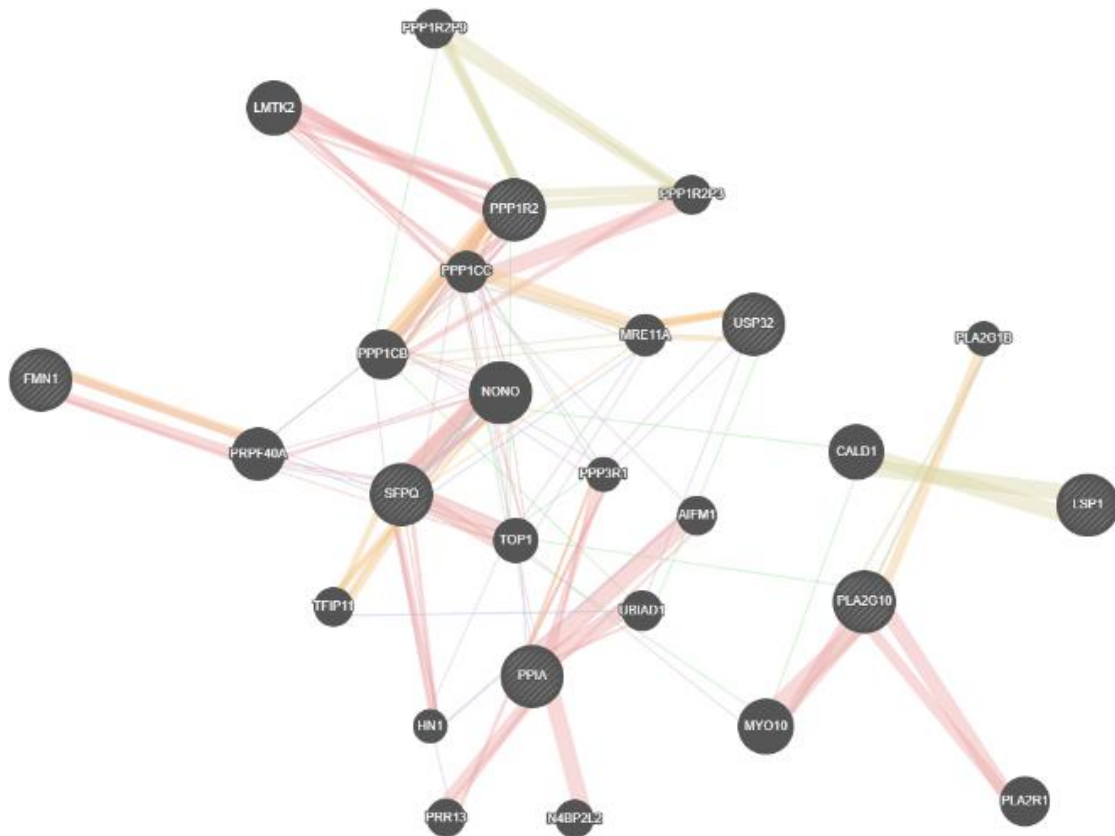
**Tabla R.3.4. Rutas en las que se encuentra implicado cada gen con expresión diferencial en presencia de SlrP en infecciones.**

Gen*	Ruta(s) en la(s) que se encuentra implicado
<i>FMN1</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Señalización por cadherina E</li> <li>• Ruta de señalización de GTPasas Rho</li> </ul>
<i>HSPA7</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Respuesta celular a estrés térmico</li> <li>• Respuesta celular a estímulos externos</li> <li>• Regulación de la respuesta mediada por HSF1</li> </ul>
<i>IGKV2D-29</i>	-----
<i>LSP1</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Señalización NF-κB</li> <li>• Ruta de señalización del receptor de lectina tipo C</li> <li>• Señalización de p38 mediada por quinasas MAP</li> </ul>
<i>PLA2G10</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Señalización por Ras</li> <li>• Metabolismo de lípidos</li> <li>• Biosíntesis de glicerofosfolípidos</li> <li>• Ruta de señalización MAPK</li> </ul>
<i>PPIA</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Señalización de citoquinas</li> <li>• Señalización por IL-12</li> <li>• Ruta de señalización de prolactina</li> <li>• Señalización por MAPK</li> <li>• Señalización NF-κB</li> </ul>
<i>PPP1R2</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Señalización mTOR</li> <li>• Señalización β-adrenérgica</li> <li>• Activación de la PKA dependiente de AMPc</li> <li>• Señalización de proteínas G</li> </ul>
<i>SFPQ</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Señalización por PTK6</li> <li>• Vía mediada por NOTH1 para la regulación de la señalización NF-κB</li> <li>• Señalización de proteínas G</li> <li>• <i>Splicing</i> de ARNm</li> </ul>
<i>USP32</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteólisis dependiente del proteosoma y ubiquitina</li> </ul>

\*Código de color. Verde: expresión activada. Rojo: expresión reprimida.

### 3.4.2 Interacciones con otros genes y otras proteínas

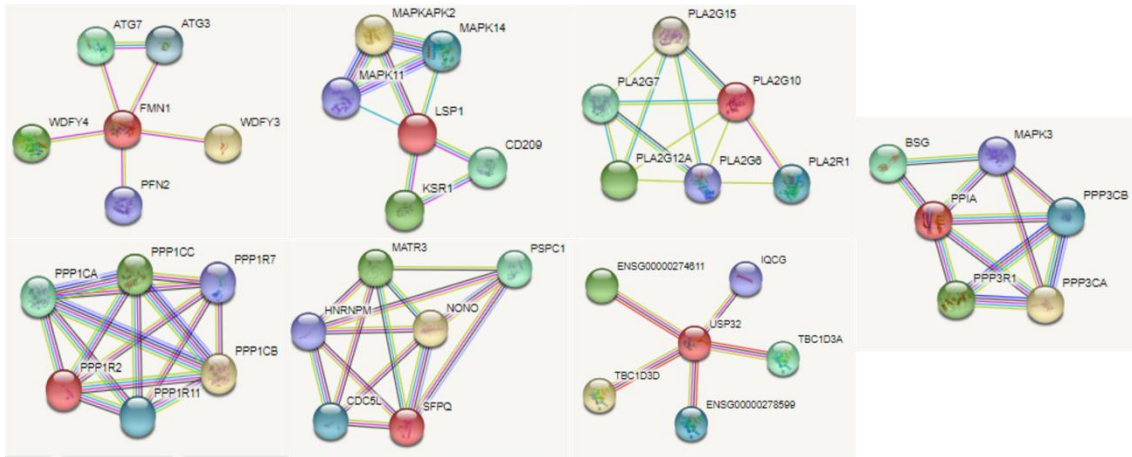
Se utilizaron dos herramientas más para el análisis global de los genes que ven modificada su expresión por la presencia de SlrP durante las infecciones. Por un lado, la herramienta GeneMANIA (Warde-Farley et al., 2010), que realiza búsquedas en bases de datos disponibles para detectar interacciones físicas (ya sea interacciones genéticas, interacción proteína-proteína o proteína-ADN). Además, es capaz de realizar predicciones de interacciones que no se hayan descrito y dar información en una sola imagen también acerca de otros datos de interés como coexpresión, colocalización o genes que formen parte de una misma ruta. El resultado se representa en la **Figura R.3.2**.



**Figura R.3.2. Resultados obtenidos con el programa GeneMANIA sobre los genes que varían su expresión en presencia de SlrP durante la infección.** En la red de interacciones, los círculos con un fondo rayado representan los genes con variación de expresión, mientras que los círculos con fondo liso representan el resto de genes necesarios para cerrar la red. Se ven líneas de varios colores: rojo (interacción física), naranja (predicciones), morado (coexpresión), verde (interacciones genéticas), celeste (pertenencia a misma ruta) y azul (colocalización).

Se puede observar en el gráfico obtenido con GeneMANIA que no aparecen datos sobre *IGKV2D-29* ni *HSPA7*, ya que la herramienta no tiene ningún dato almacenado sobre ellos. Uno de los datos más importantes que se extrae con esta herramienta es que no existe ningún tipo de relación directa entre los genes que varían su expresión en presencia de SlrP, siendo siempre necesario al menos un gen intermediario para que se produzca una conexión entre los candidatos obtenidos. Debido a esta falta de conexiones, no se produjo ningún enriquecimiento en Gene Ontology en ninguna ruta ni función biológica.

Finalmente, para reforzar la imagen que se forma de cada uno de los genes analizados, se recurrió a una última base de datos de interacciones (interacciones conocidas y predicciones) entre proteínas, STRING (Szklarczyk et al., 2019) en la que se generó una pequeña red para cada uno de los genes identificados por separado, de modo que se puedan identificar los procesos en que se encuentran implicados (**Figura R.3.3**).



**Figura R.3.3. Red individual de interacciones de los genes con expresión diferencial.** Elaborada con la base de datos STRING.

La herramienta STRING permite elaborar redes de interacciones de diferente calibre. Pueden ser redes de interacciones de proteínas amplias, en las que se incluyen interacciones más vagas o predicciones, o redes de interacciones más restringidas, en las que se obtiene un menor número de interactores con el producto de nuestro gen de interés pero presumiblemente con mayor fiabilidad. Se decidió elaborar una red por esta segunda vía, de modo que no se consiguió una imagen en la que se puedan interconectar todos los genes que ven alterada su expresión en función de la presencia de SlrP en la infección (como la mostrada anteriormente con la herramienta GeneMANIA), pero sí podemos averiguar por las proteínas más cercanas aquellos procesos que se pueden ver alterados por el efector SlrP de *Salmonella*.

Tal y como sucede en el análisis anterior con GeneMANIA, *IGKV2D-29* y *HSPA7* tampoco son reconocidos por la herramienta STRING (**Figura R.3.3**), de modo que no se puede complementar la información obtenida sobre estos genes. Para el resto de genes obtenidos, se observan interacciones del producto que codifican con otras proteínas con las que se encuentran muy relacionados. Es el caso por ejemplo de *USP32*, que interacciona con proteínas de la familia de las RAB, implicadas en transporte de vesículas; *SFPQ*, para la que se muestran relaciones con otras proteínas de unión a ácidos nucleicos o reguladoras de transcripción; o *PPP1R2* y *PLA2G10*, cuyas interacciones son con proteínas de su misma familia. También se muestran otras relaciones que hay que analizar con más detenimiento, pues para *PPIA*, como ya se mostró en el análisis con la base de datos *Reactome*, se muestran asociaciones con proteínas de señalización asociadas a las vías de calmodulina y quinasas MAP. La señalización MAP también se detecta en las interacciones mostradas con *LSP1*. Finalmente, interacciones del producto del gen *FMN1* con proteínas en principio implicadas en procesos poco relacionados como autofagia, ubiquitilación o unión a actina.



# Discusión

---



Cada uno de los T3SS de *Salmonella* es fundamental en una etapa diferente del proceso de infección de la célula eucariota. Hay descritos numerosos efectores de los T3SS, aunque no se conoce con claridad en todos los casos el papel que desempeñan durante la infección bacteriana. Con esta tesis, se pretende aportar más información sobre la función y las dianas del hospedador para dos efectores de los T3SS de *S. enterica*: SseK1 y SlrP. Ambos se secretan por los dos T3SS que posee *Salmonella* (Baisón-Olmo et al., 2015; Cordero-Alba and Ramos-Morales, 2014). Se partió de inicios diferentes para cada uno de los efectores estudiados.

Respecto al **efector SseK1**, la hipótesis de partida con la que se trabajó fue que este efector, tras translocarse a través del T3SS, sería capaz de interactuar con diferentes proteínas del hospedador, algunas de las cuales podrían ser objeto de su actividad transferasa de N-acetilglucosamina. Nuestra aproximación para encontrar nuevas dianas para el efector SseK1 se basó en un escrutinio de doble híbrido en levaduras, una técnica que permite detectar con facilidad interacciones entre proteínas *in vivo*. Este escrutinio se realizó en la tesis del doctor Baisón-Olmo, y en él se identificaron otros posibles candidatos a la interacción con SseK1 y a ser sustratos de su actividad enzimática (Araujo-Garrido et al., 2020b).

Este es el punto de partida del **Capítulo 1**. La relación de SseK1 con estos nuevos candidatos necesitaba un estudio en mayor profundidad, comenzando por verificar la interacción detectada en el escrutinio mediante otros métodos independientes. En este trabajo, se ha continuado con el estudio de la interacción del efector con el cofactor de unión a tubulina TBCB (*tubulin binding cofactor B*) y el factor de transcripción ZBTB16 (*zinc-finger and BTB-domain containing protein 16*). Se eligieron estos dos candidatos debido a que aparecieron varias veces de forma independiente en el escrutinio mencionado anteriormente, lo que reforzaba la idea de que eran candidatos reales.

La interacción del efector de *Salmonella* con las proteínas humanas TBCB y ZBTB16 se confirmó mediante técnicas independientes, a través de experimentos de co-purificación por afinidad (**Figura R.1.1**) y co-inmunoprecipitación (**Figura R.1.2**). Una vez confirmada la interacción de SseK1 con los dos candidatos se analizó si ambas proteínas podían ser sustratos de la actividad transferasa de N-acetilglucosamina de SseK1. Mientras que fuimos capaces observar esta modificación post-traducciona sobre TBCB en experimentos tanto *in vitro* (**Figura R.1.4**) como *in vivo* (**Figura R.1.5**), no detectamos que el candidato ZBTB16 fuese un sustrato de la actividad enzimática del efector de *Salmonella*.

La identificación de proteínas del hospedador que interactúen con un efector (tanto si son sustratos de su actividad catalítica como si no) es un paso esencial para comprender el papel biológico que juegan estos factores de virulencia durante el proceso de infección. El de SseK1 y ZBTB16 no es un caso aislado dentro de esta familia de efectores, ya que también, por ejemplo, se ha comprobado que SseK3 interactúa con TRIM32 (Yang et al., 2015) pero no es capaz de ejercer su actividad transferasa de N-acetilglucosamina sobre residuos de arginina de esta proteína (Günster et al., 2017). El gen *ZBTB16*, codifica una proteína que pertenece a una familia de factores de transcripción con dedos de zinc y dominios BTB (módulos normalmente implicados en interacción entre proteínas), que modulan la expresión de genes mediante modificaciones en la metilación del ADN (Mathew et al., 2012; Puszyk et al., 2013). Concretamente el producto del gen *ZBTB16*, también denominado PLZF (*Promyelocytic*

*Leukemia Zinc Finger protein*), está caracterizado como un represor transcripcional, aunque es capaz de inducir la expresión de genes estimulados por interferones (Xu et al., 2009). ZBTB16 también se localiza en el citosol y es capaz de formar un complejo heterotrimérico con las proteínas CUL3 y ROC1. Dicho complejo tiene función ligasa de ubiquitina e interviene en la regulación de la autofagia, promoviendo la degradación de la proteína ATG14L (Zhang et al., 2015b). La autofagia es un mecanismo que permite el reciclado de componentes celulares cuando en la célula se detecta algún tipo de toxicidad o estrés. Es un proceso que tiene que ser regulado con sumo cuidado, ya que también se ha descrito que una sobreactivación del proceso autofágico puede derivar en muerte celular. De hecho, uno de los sistemas defensivos de la célula hospedadora frente a patógenos intracelulares consiste en promover la autofagia mediante la activación de diferentes cascadas de señalizaciones que desembocan en la muerte celular (Costas and Rubio, 2017; Simone, 2007).

La infección por *S. Typhimurium* causa una pérdida de energía en el hospedador, haciendo disminuir su resistencia al patógeno (Ganesan et al., 2017). Este descenso de energía provoca la activación de la quinasa AMPK, implicada en el control de la vía de señalización mTOR y la autofagia, la cual restablece los niveles de energía (Hardie et al., 2012; Robinson et al., 2012). *S. Typhimurium* llega a causar la degradación en los lisosomas de AMPK junto con sus dos proteínas reguladoras, LKB1 y Sirt1, de modo que se produce un desajuste en la regulación de la autofagia (Ganesan et al., 2017). Queda claro que *Salmonella* interfiere en el proceso de autofagia, y la interacción del efector SseK1 con ZBTB16 podría ser un elemento más en esta característica de la infección, por lo que podría explorarse de forma más específica en el futuro. Además, ya se han realizado experimentos con ratones mutantes para el gen *PLZF*, los cuales se convierten en mucho más sensibles a la infección por *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* (Yin et al., 2018), lo cual reforzaría la idea de que el factor de transcripción es atacado por SseK1 para facilitar la infección del patógeno.

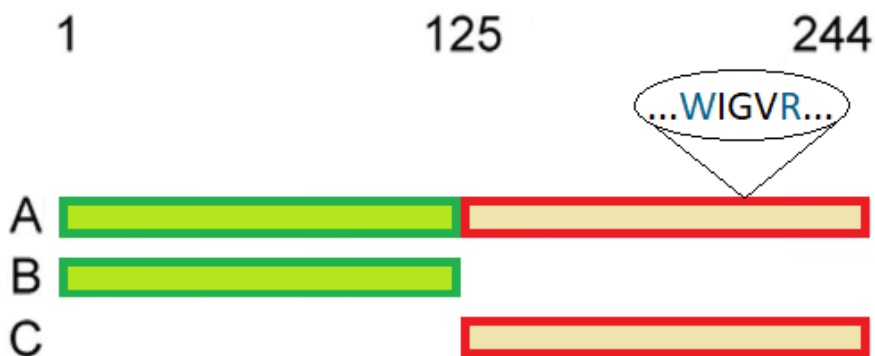
Como último apunte acerca de la relación entre el efector SseK1 y ZBTB16, es necesario remarcar que existe cierta controversia acerca de las proteínas que interactúan y que son utilizadas como sustratos por parte de los efectores de la familia NleB/SseK (Araujo-Garrido et al., 2020a). Por tanto, a pesar de que los procedimientos desarrollados en esta tesis indican que ZBTB16 no es sustrato de la actividad transferasa de N-acetilglucosamina de SseK1, podrían ser necesarias metodologías diferentes para identificar la modificación de esta diana del hospedador.

TBCB es otro de los ligandos humanos que interaccionan con SseK1. A diferencia de ZBTB16, nuestros ensayos *in vitro* nos permitieron desvelar que TBCB sí es un sustrato de la actividad enzimática de SseK1. Mediante ensayos de actividad enzimática *in vitro* utilizando proteínas purificadas en fusión con GST confirmamos que TBCB sufre N-glicosilación y que dicha modificación depende de la presencia de SseK1 (**Figura R.1.3**).

Posteriormente, se intentó determinar con más exactitud cuál o cuáles son aquellos aminoácidos o dominios importantes en TBCB para su reconocimiento y modificación por parte de SseK1. Se ha sugerido que la presencia de un motivo WR (Trp-Arg) en los sustratos de la actividad catalítica de SseK1, así como cualquier otro miembro de la familia de efectores NleB/SseK, proporciona una conformación espacial que resulta favorable para que dichos



sustratos sean reconocidos por parte del efector (Araujo-Garrido et al., 2020a). Este dominio está presente en las primeras proteínas descritas como sustratos de los efectores de esta familia incluyendo W230/R231 en TRADD, W112/R113 en FADD y W196/R197 en GAPDH (Park et al., 2018). De todos modos, la presencia del dominio WR no es imprescindible en los sustratos de la actividad catalítica de esta familia de efectores. Como ocurre, por ejemplo, en los propios sitios de automodificación de SseK1 y SseK3. A lo largo de toda la secuencia de aminoácidos de TBCB tampoco se encuentra motivo WR. Es más, en toda la proteína sólo se encuentra un residuo de triptófano, W192, siendo el residuo de arginina más cercano R196, que se encuentra a 4 posiciones de distancia (**Figura D.1A**). Hicimos la hipótesis de que este residuo R196 pudiera ser susceptible a la modificación por SseK1. Sin embargo, los experimentos de actividad *in vitro* usando el mutante puntual TBCB<sub>R196A</sub> como sustrato mostraron que la proteína humana seguía modificándose (**Figura R.1.4**). Este resultado sugiere que TBCB contiene otras argininas que son etiquetadas por SseK1. Si bien, no podemos descartar que el residuo R196 también sea modificado, ya que también cabría la posibilidad de que SseK1 ejerza su actividad modificadora sobre más de un residuo de arginina de la misma proteína. Ambas situaciones (modificación de otros residuos de arginina además de o en lugar del residuo R196) explicarían que se siga detectando señal de glicosilación de TBCB a pesar de haber modificado específicamente este aminoácido.



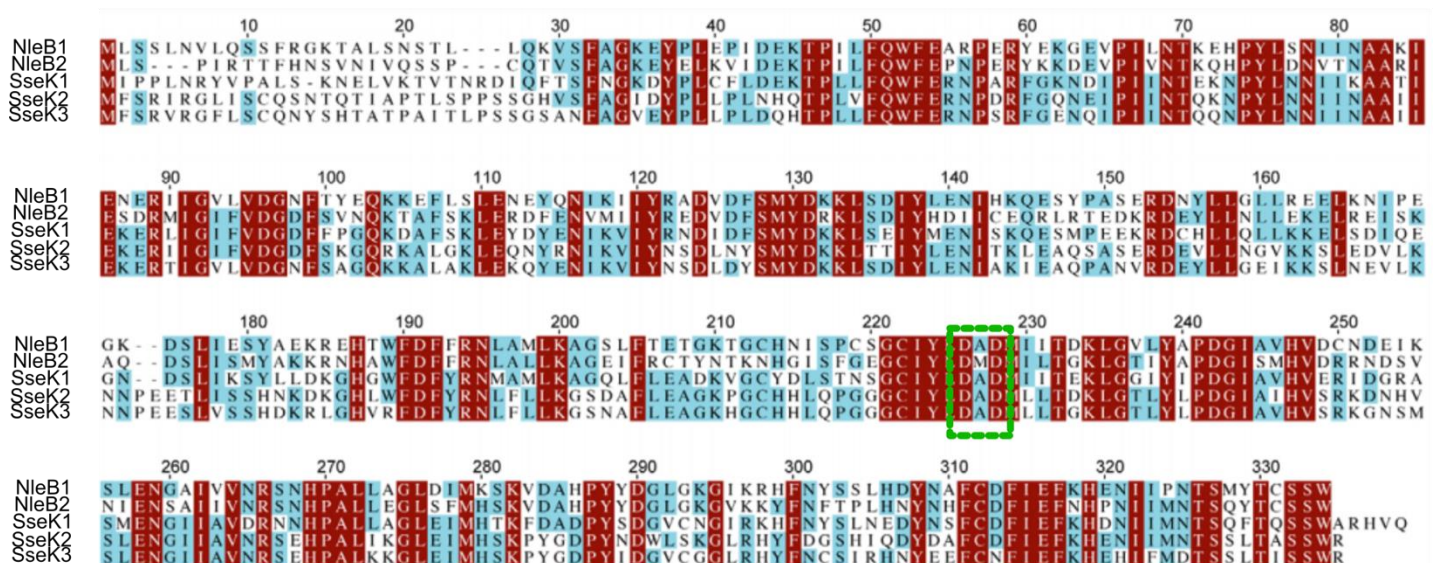
**Figura D.1. Secuencia aminoacídica de las versiones de TBCB utilizadas en este trabajo.** Se destacan en cada una de las representaciones los aminoácidos o dominios estudiados. En la representación A se resaltan los residuos W192 y R196 (azul). En las representaciones B y C se distinguen las regiones TBCB-N (verde) y TBCB-C (rojo), respectivamente.

TBCB es una proteína de 244 aminoácidos que contiene un dominio N-terminal similar a ubiquitina UBL (*ubiquitin-like*), un dominio central CC (*coiled coil*) y un dominio C-terminal de asociación al citoesqueleto, CAP-Gly (*Cytoskeleton Associated Protein Glycine-rich*) (Serna et al., 2015). En otro intento por determinar el dominio específico de TBCB que interacciona con SseK1 y que pudiera ser modificado por éste, se realizó también el experimento de actividad catalítica *in vitro* utilizando versiones truncadas de la proteína humana TBCB. Los péptidos que decidimos utilizar son los mismos que se describen y se emplean en (Tan et al., 2017), y se representan en la **Figura D.1**. De esta forma, denominamos TBCB-N a la versión de la proteína que incluye los 124 primeros aminoácidos, donde se encuentra la región N-terminal y el dominio UBL de esta proteína. También se generó la versión TBCB-C de la proteína, con los aminoácidos restantes que no se incluyeron en la versión anterior, del 125 hasta el 244 final.

En esta versión con la parte C-terminal de la proteína, encontramos los dominios CC y CAP-Gly. El resultado del experimento *in vitro* muestra que ninguna de las dos versiones generadas resulta modificada por SseK1 (**Figura R.1.4**), lo cual nos impide determinar qué dominio es modificado. La idea que sí se extrae es que parece necesaria la proteína TBCB con su longitud al completo para que se pueda desarrollar la interacción de forma adecuada y se produzca la modificación del sustrato.

Para determinar si TBCB era modificado por SseK1 en un contexto más fisiológico, se analizó mediante *western blot* el conjunto de proteínas N-glicosiladas por SseK1 tras la transfección de células epiteliales HEK293T (**Figura R.1.5**). Cuando TBCB era cotransfectada con SseK1 en las células de mamífero, al patrón de bandas modificadas por la actividad enzimática se le sumaba esta proteína. Además, para afirmar con mayor rotundidad que esa modificación se producía y se mantenía, se realizó una inmunoprecipitación de todas las proteínas sustrato de la actividad catalítica de SseK1 a partir de los mismos extractos utilizados, lo cual permitió analizar posteriormente mediante *western blot* que TBCB había sido inmunoprecipitada gracias a la modificación sufrida por SseK1 (**Figura R.1.6**).

En todos los experimentos que se han realizado, otra observación que se aprecia es la modificación sobre el propio efector SseK1, que es capaz de ejercer su actividad enzimática sobre sí mismo. Se ha detectado esta auto-modificación del efector en ensayos *in vitro* (**Figuras R.1.3 y R.1.4**) como *in vivo* (**Figura R.1.5**). Este efecto de auto-glicosilación se ha observado también en otro efector de la misma familia, SseK3 (Newson et al., 2019). Incluso, esta modificación de residuos de arginina del propio efector sobre sí mismo se ha descrito recientemente como esencial para el correcto desarrollo de la patogénesis bacteriana y el control de la apoptosis del hospedador (Xue et al., 2020). También se han desarrollado trabajos en los que se estudia la actividad enzimática de estos efectores sobre las proteínas de la propia bacteria, contribuyendo a la detoxificación de compuestos nocivos como el peróxido de hidrógeno, en el caso de NleB de *C. rodentium*, o el metilgloxal, en el caso de SseK1 en *S. enterica* (El Qaidi et al., 2020; S et al., 2021).



**Figura D.2. Alineamiento de efectores con actividad transferasa de N-acetilglucosamina.** Se muestra un alineamiento de los tres efectores de *Salmonella* con actividad transferasa de N-acetilglucosamina,

junto con NleB1 y NleB2 de *E. coli*. Se sombrea de color rojo los residuos que coinciden en los cinco efectores, y de color azul las coincidencias que no se dan en todos los casos. Por último, se resalta con un recuadro verde el dominio DxD de estos efectores. Adaptado de Brown et al (2012).

SseK1, SseK2 y SseK3 son tres efectores de *Salmonella* con una similitud muy alta. La identidad se eleva hasta un 60% comparando la secuencia de aminoácidos de SseK1 con SseK2 y SseK3, e incluso estas dos últimas alcanzan entre sí un 75% de identidad (**Figura D.2**). Los tres efectores comparten un dominio catalítico DxD que resulta imprescindible para el reconocimiento del sustrato y para su función enzimática como glicosiltransferasas (Araujo-Garrido et al., 2020). Para determinar la especificidad en la interacción SseK1-TBCB, se ensayó la interacción de la proteína humana con los otros efectores de la familia SseK. Se detectó una interacción estable de SseK3 con TBCB (**Figura R.1.8**), aunque TBCB no era glicosilada en presencia de este efector. Este hecho va en consonancia con otros trabajos, de los que se deduce que hay cierta redundancia entre los diferentes efectores que componen la familia NleB/SseK, aunque también cierta especificidad en los sustratos de su actividad bioquímica (Günster et al., 2017). Por tanto, la unión estable a otras proteínas y la actividad catalítica son aspectos diferentes que no siempre coinciden entre los elementos de esta familia: por ejemplo, SseK1 es capaz de interactuar con GAPDH y ejercer su actividad de glicosilación de argininas sobre ella (El Qaidi et al., 2017); mientras que SseK3 interactúa con TRIM32 pero no glicosila ninguno de sus residuos de arginina (Günster et al., 2017). También hay que destacar que se aprecia la capacidad de SseK3 para ejercer su actividad enzimática sobre sí misma, al igual que lo observado con SseK1.

Tal y como sucedió con el efector SseK1, en el ensayo de doble híbrido se observó que SseK3 interactúa con TBCB (**Figura R.1.8**), aunque no es capaz de llevar a cabo su modificación en ensayos de glicosilación *in vitro* (**Figura R.1.7**). Cuando se utilizaron las versiones truncadas TBCB-N y TBCB-C, no se detectaron interacciones con los efectores SseK1 ni SseK3 (**Figura R.1.9**). Existen más estudios en los que también se describe la interacción de TBCB con otras proteínas, si bien no en todos se especifica si hay algún dominio o región de TBCB determinante para la interacción. Por ejemplo, la proteína humana HILI, también conocida como PIWIL2, interactúa con TBCB y se determinó que el dominio UBL de la región N-terminal de TBCB es imprescindible para que dicha interacción se produzca (Tan et al., 2017). Por otra parte, está descrito que los dominios CAP-Gly, como el que se incluye en la región C-terminal de TBCB, sirven como sitios de reconocimiento para otros péptidos (Weisbrich et al., 2007). Por tanto, parece que no siempre el mismo dominio de TBCB es fundamental para sus interacciones con otras proteínas.

Por último, también hay casos, como la interacción de TBCB con p150, en los que no se indica un dominio específico del cofactor que sea esencial para la interacción (Kuh et al., 2012), lo cual sugeriría que es necesaria la proteína completa para que se produzcan algunas interacciones. Probablemente se necesite una conformación específica de TBCB para que se produzca la interacción analizada en este trabajo con SseK1, y por ese motivo podría explicarse el hecho de no observar interacción con ninguno de los dominios por separado. También hay que destacar que, respecto a dominios importantes para que se produzca la interacción, el dominio catalítico DxD de SseK1 y SseK3 es fundamental no solo a la hora de transferir

residuos de N-acetilglucosamina a sus sustratos, sino que también son vitales para el reconocimiento de otras proteínas. De esta manera, versiones del efector con el dominio DxD modificado son incapaces de interactuar con TBCB (**Figura R.1.9**). Este efecto va en consonancia con otros estudios que muestran que cambios en el dominio DxD de SseK3 llevan a que se pierda la interacción con su ligando TRIM32 (Yang et al., 2015).

Respecto a SseK2, no se detectó que tuviera la capacidad de glicosilar a TBCB, ni siquiera de interactuar con esta proteína del hospedador (**Figuras R.1.7 y R.1.8**). SseK2 es uno de los efectores de la familia NleB/SseK sobre los que existe cierta controversia en cuanto a su actividad transferasa de N-acetilglucosamina. Existen estudios que llegan a ideas completamente opuestas, ya que se ha reportado que SseK2 ejerce la misma actividad enzimática que el resto de los efectores de su familia sobre FADD (El Qaidi et al., 2017), mientras que otros estudios apuntan a que este efector carece siquiera de actividad glicosiltransferasa (Günster et al., 2017; Newson et al., 2019). Nuestro trabajo apoya más esta segunda idea, ya que no hemos detectado la auto-modificación que sí se pudo ver para SseK1 y SseK3. Podría suceder que SseK2 catalizara una reacción de modificación diferente, que no pudiera ser detectada mediante el anticuerpo utilizado en este trabajo (anti-ArgGlcNAc), idea ya lanzada con anterioridad por (Günster et al., 2017).

La función más ampliamente descrita de los efectores de la familia NleB/SseK es la de interferencia en la vía de señalización NF- $\kappa$ B y la muerte celular, mediante la modificación de proteínas que contienen dominios que activan la ruta apoptótica, denominados dominios de muerte o *death domains (DD)* (Günster et al., 2017; Li et al., 2013; Newson et al., 2019; Pearson et al., 2013). También se han descrito otros ligandos diferentes para los efectores de la familia NleB/SseK (Araujo-Garrido et al., 2020a). Por ejemplo, GAPDH es utilizado por diferentes efectores como sustrato de su actividad glicosiltransferasa: así sucede con NleB, de *C. rodentium* (Gao et al., 2013); NleB1 de *E. coli* enterohemorrágica; y SseK1 de *S. enterica* (El Qaidi et al., 2017). Cuando GAPDH es modificada por estos efectores, también se interfiere en la señalización NF- $\kappa$ B intracelular, gracias a la interferencia en la interacción de GAPDH con TRAF2 y TRAF3 y en la señalización de interferones tipo I (Gao et al., 2013; Gao et al., 2016).

Además se han sugerido otras funciones asociadas a estos efectores, como es el caso de NleB1 de *E. coli* enteropatogénica, debido a su capacidad de interactuar con la subunidad  $\alpha$  del factor inducible por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ) y también de transferir N-acetilglucosamina a sus residuos de arginina (Xu et al., 2018). HIF-1 es un regulador que coordina la respuesta a hipoxia, activando la transcripción de numerosos genes implicados en metabolismo energético, angiogénesis y apoptosis (Hirota, 2020). La modificación de este regulador por parte de NleB1 potencia su actividad transcripcional, generando cambios drásticos en el metabolismo de la glucosa del hospedador. NleB1 incluso también ejerce su actividad catalítica sobre HIF-2 $\alpha$ , aunque no modifica la actividad transcripcional de este regulador (Xu et al., 2018).

Aparecen en la literatura trabajos previos donde se analiza la contribución de estos efectores de *Salmonella* durante el proceso de infección. El primer estudio que describía a los efectores SseK1 y SseK2 de *S. Typhimurium* no detectó atenuación de los mutantes  $\Delta$ sseK1,  $\Delta$ sseK2 ni del doble mutante  $\Delta$ sseK1  $\Delta$ sseK2 en infecciones de cultivos celulares ni en ratones BALB/C (Nrpmp1<sup>5</sup>) (Kujat Choy et al., 2004). En otro estudio, se observó que el triple mutante  $\Delta$ sseK1

$\Delta sseK2 \Delta sseK3$  tenía defectos en el crecimiento intracelular en macrófagos RAW264.7, y confirmó que en ratones no se producía atenuación (Buckner et al., 2011). Utilizando infecciones mixtas, sí que se detectó una leve atenuación del doble mutante  $\Delta sseK1 \Delta sseK2$  en infecciones orales en ratón; aunque no se apreciaron diferencias entre éste y el triple mutante  $\Delta sseK1 \Delta sseK2 \Delta sseK3$ , sugiriendo que SseK3 no es relevante en la virulencia de *Salmonella* en este sistema (Brown et al., 2011). También se ha publicado una atenuación leve del mutante  $\Delta sseK1$  de *S. Typhimurium* tras infectar por vía oral e intraperitoneal a ratones BALB/c (Baisón-Olmo et al., 2015). El mutante  $\Delta sseK1$  de *S. Enteritidis* disminuye la formación de biofilm y la supervivencia intracelular en macrófagos peritoneales de ratón activados, además de ser menos patógeno en ratones BALB/c (Yang et al., 2018). En la misma línea, un mutante  $\Delta sseK2$  de *S. Typhimurium* presenta carencias en la formación del biofilm y la virulencia (Zhang et al., 2019).

Por otra parte se ha comprobado la importancia de la actividad catalítica de otros efectores de la misma familia dentro del proceso de virulencia. Así, un mutante *nleB* de *C. rodentium* ve reducida su capacidad de colonización en ratones y de causar hiperplasia en el colon (Kelly et al., 2006), defectos que no se ven compensados cuando dicho mutante se complementa con otro mutante en el que el efector NleB tiene su dominio catalítico DxD modificado (Gao et al., 2013).

En este trabajo se describe una nueva función del efector SseK1 no descrita anteriormente y que no muestra relación con otros efectos identificados para proteínas de la misma familia. Aquí mostramos la existencia de una nueva proteína del hospedador, TBCB, con la que interactúan tanto SseK1 como SseK3. Además, es sustrato de la actividad transferasa de N-acetilglucosamina de SseK1. TBCB es uno de los cinco cofactores de unión a tubulina (TBCA-E), los cuales mediante sus interacciones con  $\alpha$ - o  $\beta$ -tubulina pueden controlar la dinámica de formación de dímeros de tubulina (Lopez-Fanarraga et al., 2001; Tian et al., 1996). Se ha demostrado en experimentos *in vitro* e *in vivo* que TBCB y TBCE forman un complejo junto con  $\alpha$ -tubulina que da lugar a la disociación de la tubulina (Kortazar et al., 2007). Un aumento en la expresión de TBCB da lugar a desestabilización de los microtúbulos y causa una caída en la densidad de éstos (Tan et al., 2017). La función de TBCB se puede regular mediante modificaciones postraduccionales. Por ejemplo, la gigaxonina, un adaptador específico para ciertos sustratos de un complejo E3 ligasa de ubiquitina, promueve la ubiquitilación y posterior degradación por el proteosoma de TBCB junto con otras proteínas relacionadas con microtúbulos (Allen et al., 2005; Wang et al., 2005). También regula la dinámica de microtúbulos PAK1 (*p21-activated kinase 1*), a través de la fosforilación de TBCB (Vadlamudi et al., 2005); y HILI, mencionada anteriormente, impide la polimerización de microtúbulos gracias a que inhibe la ubiquitilación de TBCB y, por tanto, su degradación. HILI también interfiere en la fosforilación de TBCB promovida por PAK1 (Tan et al., 2017).

Por tanto, nuestros resultados abrían la posibilidad a que estos efectores de *Salmonella* tuvieran un efecto no descrito aún sobre el hospedador. Por ello, decidimos estudiar el impacto que tienen SseK1 y SseK3 sobre el citoesqueleto y los microtúbulos del hospedador. Dicho estudio lo realizamos a través del análisis de la acetilación del residuo lisina 40 de la  $\alpha$ -tubulina, ya que esta modificación está asociada a los microtúbulos que han sido estabilizados (Webster and Borisy, 1989b). Se utilizó esta acetilación como marcaje para hacer el

seguimiento de la estabilidad de los microtúbulos en presencia de los efectores mencionados. Nuestros experimentos mostraron que la expresión de SseK1 y SseK3 en células HEK293T incrementan los niveles de acetilación de la lisina 40 de la  $\alpha$ -tubulina (**Figura R.1.10**). Además, se puede observar que estos niveles de acetilación de tubulina son dependientes de la actividad enzimática del efector. Cuando se transfectaron las células HEK293T con los efectores SseK1 y SseK3 con el dominio catalítico DxD puntualmente modificado, el efecto descrito desaparece, resaltando la importancia de la actividad enzimática de estos efectores. Todos juntos, estos datos sugieren la posibilidad de que las actividades de SseK1 y SseK3 puedan intervenir en la estabilidad de los microtúbulos. Aunque ambos efectores forman parte de la misma familia, la vía que siga cada uno de ellos para intervenir sobre la dinámica de microtúbulos podría ser diferente en cada caso, dada la capacidad de SseK1 de glicosilar a TBCB mientras que SseK3, aunque también influye en la acetilación de tubulina, no ejerce su actividad glicosil transferasa sobre la proteína humana.

La reestructuración del citoesqueleto es una de las estrategias de las que disponen *Salmonella* y otros patógenos para manipular al hospedador (de Souza Santos and Orth, 2015). Esta manipulación de los microtúbulos se da a varios niveles. Varios efectores translocados por el T3SS-1 de *Salmonella*, entre los que se encuentran SopE/E2, SopB, SipC, SipA y SptP tienen como función la alteración del citoesqueleto de actina, provocando la producción de protrusiones en la membrana que facilitan la entrada del patógeno en el hospedador (Hayward and Koronakiss, 2002).

El citoesqueleto es esencial no sólo para el transporte intracelular de vesículas, sino también para el posicionamiento de los orgánulos en la célula. Una vez *Salmonella* se ha introducido en la célula hospedadora, se establece en un nicho intracelular denominado SCV (*Salmonella-Containing Vacuole*). La SCV, durante su maduración, se sitúa en una posición muy cercana al núcleo y al centro organizador de microtúbulos. Esta localización subcelular de la SCV es específica, de forma que optimiza la replicación de *Salmonella* en el hospedador (Abrahams et al., 2006; Ramsden et al., 2007).

Muchos de los efectores translocados por el T3SS-2 de *Salmonella* tienen como diana la SCV, pero también las vesículas lisosomales/endosomales tardías y los SIFs. Se ha observado que los efectores que se asocian con los SIFs también interactúan con los microtúbulos (Rajashakar and Hensel, 2011). Esta asociación con los microtúbulos, en el caso de los efectores SseF y SseG, promueve alteraciones en el citoesqueleto que inducen la formación de haces de microtúbulos (Kuhle et al., 2004). También estos efectores, junto con SifA y PipB2, colaboran en el mantenimiento de la localización de la SCV a la vez que extienden las tubulaciones generadas por *Salmonella*, mediante el reclutamiento de las proteínas motoras kinesina y dineína (Jennings et al., 2017). SseJ es otro efector de *Salmonella* que interviene en este proceso. Tiene una actividad fosfolipasa que esterifica moléculas de colesterol en células infectadas (Figueira and Holden, 2012), aportando rigidez a la SCV. Tiene una función análoga a SifA, y en el equilibrio de la actividad de ambos efectores aparentemente reside el control de la SCV (Figueira and Holden, 2012). Se ha observado además que la expresión ectópica de SseJ en células del hospedador desregula la dinámica de microtúbulos (Raines et al., 2017).

Las funciones de SseK1 y SseK3 no tendrían por qué ser redundantes ni seguir la misma ruta biológica a pesar de que el efecto final que se analiza en este estudio sea el mismo. Tal y como se ha expuesto, la principal diferencia reside en la capacidad de cada efector de ejercer su actividad catalítica sobre TBCB: SseK1 modifica a esta proteína del hospedador pero SseK3 sólo es capaz de interactuar con ella sin modificarla. También, como se extrae de la **Figura R.1.10**, la localización de estos dos efectores es diferente, observándose la localización de SseK1 en el citosol, mientras que SseK3 parece localizarse específicamente en el aparato de Golgi, como también han observado otros autores (Gan et al., 2020; Yang et al., 2015). Otro elemento que diferencia a los efectores, aunque es más apreciativo, es la característica pérdida de la fisonomía celular que sufren aquellas células que expresan SseK3, quedando con una forma esférica, hecho que no sucede con la expresión de SseK1, en que se mantiene la estructura típica de las células epiteliales.

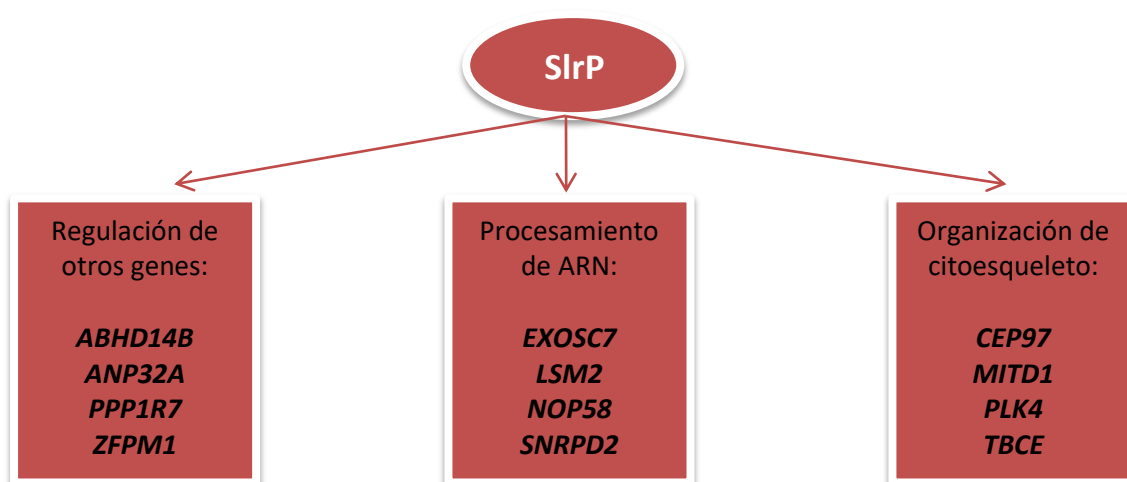
Nuestro trabajo sugiere la posibilidad de que SseK1 y SseK3 pudieran estabilizar los microtúbulos mediante su interacción con TBCB, además de su modificación por parte de SseK1. Incluso, podrían participar en otros procesos como la localización subcelular de la SCV en la célula hospedadora, el control de los filamentos inducidos por *Salmonella* o la optimización del nicho reproductivo de *Salmonella* durante la infección. Todas estas vías deben ser exploradas con experimentos que puedan arrojar algo de luz sobre esta función biológica de estos efectores de la familia NleB/SseK, alejada de la ya descrita interferencia sobre la respuesta inflamatoria del hospedador.

En el contenido restante de esta tesis, el trabajo se centra en el **efector SlrP** de *Salmonella*. Se realizaron diferentes estudios con la finalidad de conocer con más profundidad los efectos de SlrP en la célula hospedadora. Este objetivo se enfocó desde dos perspectivas diferentes: la búsqueda de proteínas del hospedador que interactúen con SlrP y el análisis transcriptómico de la célula hospedadora en diferentes condiciones.

Un detalle que puede resultar crucial a la hora de comprender el desempeño de un efector es determinar las interacciones que presenta con proteínas del hospedador. Por ello, en el **Capítulo 2**, se abordó la búsqueda de interacciones de SlrP con proteínas del hospedador que pudieran ser dianas de su actividad ligasa de ubiquitina. La técnica del doble híbrido en levaduras es muy eficaz en el proceso de detección de interacciones, y ha sido utilizada con éxito anteriormente en nuestro laboratorio, pues abrió la puerta al estudio de la relación entre el efector SlrP y las proteínas humanas Trx y ERdj3 (Bernal-Bayard and Ramos-Morales, 2009; Bernal-Bayard et al., 2010); o tal y como se ha presentado en el primer capítulo de esta Tesis, para el estudio de la relación entre SseK1 y TBCB. Precisamente el éxito reciente obtenido en el escrutinio del efector SseK1, gracias a una genoteca de ADNc de células Jurkat cedida por el profesor Francisco Romero Portillo, fue el que propició realizar un nuevo escrutinio con SlrP, el efector más estudiado en nuestro laboratorio. Ya se realizó hace varios años un escrutinio de SlrP, utilizando una genoteca comercial. Con el conocimiento generado, se esperó obtener alguna de las dos proteínas humanas ya descritas como prueba de la fiabilidad del proceso y de la genoteca empleada, además de la aparición de nuevos candidatos que no se hubieran podido identificar anteriormente, y eso fue exactamente lo que sucedió.

Los resultados obtenidos en el escrutinio reflejaron inicialmente 588 candidatos en la interacción con SlrP. Tras identificarlos mediante diferentes técnicas, como secuenciación de los plásmidos de la genoteca purificados y reacciones PCR con oligonucleótidos específicos para genes concretos, se constató que 220 de los candidatos, más de un tercio del total, correspondían al gen de la tiorredoxina (**Tabla R.2.1**). Este resultado fue indicativo de que el procedimiento realizado en este escrutinio era adecuado. Los candidatos restantes conformaron hasta otros 30 genes más, apareciendo en diferentes frecuencias, desde las 236 veces del candidato más repetido (SNRPD2, con una frecuencia similar a la de Trx, lo que suponía otro tercio del total para un solo candidato) hasta una única vez en el caso de varios candidatos.

Se utilizó un plásmido de cada uno de los candidatos obtenidos para volver a transformar L40 y confirmar en el sistema de doble híbrido la interacción que se había obtenido con el escrutinio inicial, siguiendo el esquema mostrado en la **Figura R.2.4**. Así se verificaron 14 genes del hospedador cuyos productos podrían interactuar con SlrP: *ABHD14B*, *ANP32A*, *CEP97*, *EXOSC7*, *LSM2*, *MITD1*, *NOP58*, *PLK4*, *PPP1R7*, *RABIF*, *SNRPD2*, *TBCE*, *XRCC6* y *ZFPM1* (**Figura R.2.5**). Atendiendo a la descripción ofrecida en el Capítulo 2 sobre las implicaciones de cada uno de estos genes (**Tabla R.2.2**), se puede observar la diversidad de funciones en las que se encuentran implicados. Sin embargo, se pueden hacer algunas agrupaciones de los candidatos por similitud entre las funciones que se han descrito para ellos (**Figura D.3**) de modo que se puede ver de una forma más global las vías en las que SlrP actúa sobre el hospedador.



**Figura D.3.** Esquema de los procesos globales que engloban a los candidatos obtenidos en el escrutinio mediante el sistema de doble híbrido.

Llama la atención que de todos los candidatos identificados, varios se corresponden con genes que están implicados en regulación de la expresión de otros genes. *ABHD14B* forma parte de este grupo de genes, como miembro de la familia de enzimas hidrolasas de serina. Además de la primera función sugerida para el producto del gen *ABHD14B* en la iniciación de la transcripción (Long and Cravatt, 2011; Padmanabhan et al., 2003), recientemente se le ha atribuido otra función como desacetilasa de lisinas modificadas postraduccionalmente, para transferir dicho grupo acetilo a la coenzima A (CoA), formando finalmente acetil-CoA



(Rajendran et al., 2020). Esta actividad catalítica ya se ha descrito para otras familias de enzimas, las sirtuinas y las desacetilasas de histonas (HDACs), implicadas ambas en la regulación epigenética (Delcuve et al., 2012; Imai and Guarente, 2014). Se sospecha que el producto del gen *ABHD14B* podría estar implicado en el mantenimiento del metabolismo general de la célula (Rajendran et al., 2020), por lo que de suponer una diana real para SlrP podría verse desde la perspectiva de *Salmonella* como la generación de desórdenes metabólicos de los que el patógeno pudiera sacar beneficio. En una línea similar podemos encontrar el gen *ANP32A*. Forma parte de una familia de proteínas nucleares con versatilidad funcional, implicadas en múltiples rutas celulares, como la regulación epigenética de la transcripción a través de la remodelación de cromatina o la exportación al citoplasma del ARN mensajero (Reilly et al., 2014; Seo et al., 2001). Las proteínas de esta familia, incluida ANP32A, cuentan en su estructura con un dominio LRR (*leucine-rich region*) en la región N-terminal, el cual interacciona con los dominios LRR de otras proteínas (Matsushima et al., 2018), siendo precisamente el efector SlrP una proteína que contiene el mismo dominio. A pesar de ser preferentemente de expresión nuclear, ANP32A es capaz de cambiar de localización en respuesta a cambios en la célula. De tener una localización inicial en el citoplasma de la célula, puede sufrir una translocación al núcleo causada por la presencia de especies reactivas de oxígeno (Martinvalet et al., 2005). También puede translocarse en el sentido contrario, ya que se ha descrito que ANP32A abandona el núcleo en dirección al citoplasma en respuesta a señales de apoptosis (Pan et al., 2009). Por tanto, ANP32A sería más accesible para SlrP, ya que en ciertas condiciones podrían encontrarse físicamente en la misma localización de la célula hospedadora.

En esta categoría también se incluye el gen *PPP1R7*. Este gen produce la proteína PPP1R7, que también se conoce por el nombre de SDS22, la cual regula la actividad de la fosfatasa de serina y treonina PP1. La fosfatasa PP1 se expresa en todas las células eucarióticas, y supone la proteína con mayor actividad fosfatasa en muchos extractos de tejidos (Heroes et al., 2013; Ingebritsen et al., 1983). PPP1R7 es una proteína de 360 aminoácidos, que cuenta con hasta 12 dominios LRR, lo que sugiere que la interacción detectada con SlrP puede ser real. Los péptidos de PPP1R7 que se identificaron en nuestro escrutinio no incluían la región N-terminal (**Tabla R.2.1**). En las secuencias de los clones detectados en este escrutinio se incluían hasta 7 de los dominios LRR con los que cuenta este regulador, por lo que se esperaría que la interacción se produjera específicamente en esta región. Como se puede observar posteriormente, el fragmento de PPP1R7 expresado a partir del clon obtenido en el escrutinio no es ubiquitilado *in vitro* por SlrP (**Figura R.2.7**). No podemos descartar que esta proteína hospedadora sea un sustrato de SlrP, ya que no hemos trabajado con la proteína completa y podrían faltar dominios o motivos de la proteína que fuesen importantes para un correcto plegamiento y eso podría dificultar el acceso de la ligasa de ubiquitina a la lisina del sustrato. Las principales funciones de las proteínas reguladoras de PP1, como PPP1R7, es la de acotar su ubicación a una localización subcelular específica, restringir su actividad catalítica e influir en la selectividad de sustratos de su actividad (Ferreira et al., 2019; Kumar et al., 2016). El hecho de ser una posible diana de SlrP aportaría otra perspectiva de los desequilibrios en la homeostasis celular que pudiera causar este efector.

Por último, también formaría parte de este grupo de reguladores el gen *ZFPM1*. Respecto a este gen, la proteína codificada por el clon detectado en el escrutinio sólo incluye 126

aminoácidos de la región C-terminal (**Tabla R.2.1**). En este fragmento C-terminal de ZFPM1 se encuentra incluido uno de los dominios de dedos de zinc que intervienen en la interacción con el factor de transcripción GATA1 (Snow and Orkin, 2009), aunque deja fuera una gran parte de la proteína. La región no representada de ZFPM1 contiene otros 8 dominios de dedos de zinc, siendo algunos de ellos también necesarios para la interacción con GATA1, así como otros dominios de unión a complejos proteicos y algunos residuos específicos que son modificados postraduccionalmente y modulan la actividad de la proteína (Snow and Orkin, 2009; Snow et al., 2010). La escasa longitud del clon impide analizar la interacción igual que si ZFPM1 tuviera todos sus aminoácidos y un plegamiento total. Este hecho, sumado a que la principal función descrita para ZFPM1 es la de regulación en el ámbito de la diferenciación celular y hematopoyesis (Gregory et al., 2010; Hong et al., 2005), hace que la interacción detectada de SlrP con ZFPM1 se tome con más cautela.

También encontramos en el procesamiento de ARN de diferentes tipos una función común entre algunos de los candidatos identificados en el escrutinio de SlrP. Uno de los genes con esta función de procesado del ARN es *EXOSC7*. El producto de este gen es la proteína RRP42, una subunidad estructural del exosoma. El exosoma es un complejo que se encarga del procesado del ARN y también la degradación de diversos tipos de ARN, atacándolos desde el extremo 3' con las exonucleasas correspondientes (Chekanova et al., 2002). También se puede incluir en este grupo al gen *NOP58*. El gen *NOP58* codifica una proteína que forma parte de un complejo junto con las proteínas Nop56 y fibrilarina. Este complejo se asocia con pequeños ARN del nucleolo dando lugar a ribonucleoproteínas, las cuales participan en la maduración, estabilización y funcionalidad del ARN (Hutzinger et al., 2009; Lyman et al., 1999). Respecto a este gen, la proteína codificada por el clon detectado en el escrutinio sólo incluye 169 aminoácidos de la región C-terminal, lo que supone un tercio del total de la proteína (**Tabla R.2.1**). En este péptido no se encuentran incluidos la mayoría de los residuos relevantes descritos para la interacción entre los diferentes componentes de las ribonucleoproteínas, ni tampoco para la dimerización que puede producirse de la propia proteína NOP58 (Zhang et al., 2006a), por lo que no se puede suponer, a raíz de la interacción detectada en este escrutinio, que SlrP pudiera interferir en las otras interacciones de NOP58.

También se incluyen en este grupo de genes implicados en procesamiento de ARN *LSM2* y *SNRPD2*. Merece una mención especial *SNRPD2*, ya que sólo las interacciones con este gen suponen un tercio del total de interacciones detectadas (**Tabla R.2.1**). Además, en el posterior ensayo de ubicuilitación sobre algunos candidatos, fue el único candidato de los que se seleccionaron que se comportó como sustrato de la actividad ligasa de ubicuitina de SlrP (**Figura R.2.7**). Estos dos genes se encuentran estrechamente relacionados, comenzando porque *SNRPD2* produce una proteína Sm (*small nuclear ribonucleoprotein Sm D2*). Las proteínas Sm se identificaron inicialmente porque constituían las dianas de los autoanticuerpos de pacientes de lupus (Lerner and Argetsinger Steitz, 1979). Todas estas dianas correspondían con diferentes ribonucleoproteínas implicadas en *splicing* (Stark et al., 2001), por lo que ya se anticipa que ambos genes tienen en común su función. Estas proteínas Sm se organizan en un complejo de siete proteínas que forman un anillo alrededor de zonas ricas en uridina de pequeños ARN (Leung et al., 2011). Las proteínas Sm tienen secuencias conservadas muy características, sin embargo, posteriormente se fueron descubriendo otras proteínas con plegamientos y secuencias similares, dando lugar a las proteínas '*Sm-like*' (Mund

et al., 2011), como la codificada por el gen *LSM2* (*U6 snDNA-associated Sm-like protein*). Así, LSM2 se puede asociar con otras proteínas de su misma familia (en su caso, el conjunto de siete proteínas está formado por LSM2 a LSM8) para formar el anillo y unirse al ARNm. Sin embargo, LSM2 también puede realizar otra función adicional, en la degradación de ARNm. El mismo complejo en forma de anillo mencionado anteriormente, solo que formado por proteínas de la familia LSM (de LSM1 a LSM7) participa en la eliminación de la caperuza en el extremo 5' del ARNm previo a su degradación. Concretamente se encarga del primer paso de unión del complejo al ARN (Coller and Parker, 2004). Esta última función es importante desde la perspectiva de la localización del complejo LSM1-7, que es citoplásmica, por lo que podría resultar más accesible para SlrP.

Podrían entenderse todas estas conexiones del tratamiento de ARN con el efector SlrP de *Salmonella* en el contexto de que éste último facilitara la adaptación de la dinámica del hospedador a los intereses de la bacteria. También habría que incidir en que la mayoría de los genes humanos que se han mencionado hasta el momento, dada la función que tienen de regulación de genes o procesado de ARN, se localizan en el núcleo de la célula hospedadora. Para darle sentido a las interacciones detectadas con SlrP y profundizar en el estudio de la relación con estas proteínas, habría que demostrar previamente que SlrP fuera capaz de interactuar con estas proteínas antes de su transporte al núcleo, o bien que el efector de *S. enterica* fuera capaz de acceder al núcleo de la célula hospedadora. Hasta el momento, se ha descrito que la localización de SlrP en la célula hospedadora cuando se transloca desde *Salmonella* es citoplásmica.

Finalmente, tenemos un último grupo de genes identificados en el escrutinio de SlrP que se han agrupado dentro de la temática denominada 'organización del citoesqueleto', ya que se encuentran relacionados a diferentes niveles con la distribución de microtúbulos en la célula. El primero de los genes que se van a tratar de este grupo es *CEP97*, un gen cuyo producto es la proteína CEP97. CEP97 consta de 865 aminoácidos y, entre los dominios que tiene, cuenta con una región (50-200) en la parte N-terminal con múltiples dominios LRR. Precisamente es la parte N-terminal la que aparece truncada en el clon que se ha identificado en el escrutinio, ya que le faltan los 120 primeros aminoácidos (**Tabla R.2.1**) y por tanto aproximadamente la mitad de la región con los dominios LRR. Sin embargo, podría ser suficiente con los dominios LRR con los que cuenta este clon para producirse la interacción con SlrP. CEP97 se encuentra muy conservada entre los eucariotas, su localización se encuentra en el polo distal de los centriolos y limita la elongación de éstos en los vertebrados (Kohlmaier et al., 2009; Schmidt et al., 2009). Los centriolos son unas estructuras complejas elaboradas a partir de microtúbulos, responsables de la formación de centrosomas y cilios (Quarmby and Parker, 2005). La pérdida en la expresión del gen *CEP97* conlleva la formación prematura de cilios y una elongación anormal del centriolo en células en división; mientras que la sobreexpresión de *CEP97* reprime la formación de cilios (Spektor et al., 2007). Ya se ha descrito la ubicuutilización de CEP97 por parte de los complejos E3 correspondientes en el hospedador, con efectos de regulación de ciliogénesis (Nagai et al., 2018), por lo que también podría suponer que esta proteína fuera un sustrato de la actividad ligasa de ubiquitina de SlrP. De este modo, podría promoverse en el hospedador la ciliogénesis, que favorecería un aumento de desórdenes celulares y otros fenómenos, como modificaciones en la disposición de microtúbulos y polimerización de actina que pudiera desembocar en un mayor efecto de *membrane ruffling*, aumentando la superficie

celular para incrementar las posibilidades de *Salmonella* de entrar al hospedador. En estrecha relación con los centriolos también se encuentra el gen *PLK4*, dentro de los genes identificados en el escrutinio de SlrP. El gen *PLK4* codifica la quinasa de serina y treonina PLK4. PLK4 es el principal regulador de la duplicación del centriolo, además de ser el marcador más antiguo conocido de la localización del ensamblaje del procentriolo (Habedanck et al., 2005). En vertebrados, PLK4 es reclutada por los centriolos parentales en la fase G1 para unirse a sus receptores específicos y permitir el avance de fases del ciclo celular (Breslow and Holland, 2019). La quinasa PLK4, al igual que todas las proteínas de la familia PLK (*polo-like kinase*), cuenta en su estructura con un dominio quinasa catalítico en su región N-terminal y un dominio PBD (*polo-box domain*) en la región C-terminal (Archambault et al., 2015). En el caso de este gen, los clones detectados sólo incluyen la región C-terminal (**Tabla R.2.1**), por lo que la interacción con SlrP se restringe al dominio PBD. Los dominios PBD de las proteínas de la familia PLK son esenciales para su correcta localización y para desarrollar de forma adecuada su actividad quinasa, y de hecho constituyen una diana para la inhibición de las proteínas PLK (Scharow et al., 2016; Zitouni et al., 2014). La duplicación del centriolo es un proceso muy sensible a fluctuaciones en los niveles de expresión de PLK4 y, por ello, esta proteína está sometida a una regulación constante. PLK4 forma homodímeros a través de interacciones de sus dominios PBD, lo que permite que este dímero de quinasas se autofosfore (Cunha-Ferreira et al., 2013; Shimanovskaya et al., 2014). Esta autofosforilación crea un sitio de unión para la ligasa de ubiquitina SCF, que identifica y marca a PLK4 activa para su degradación en el proteosoma, de modo que se controla la cantidad de PLK4 en función de su actividad (Holland et al., 2010). La aparición del gen *PLK4* en el escrutinio de SlrP contribuye a la idea de la posible manipulación del centriolo por parte del efector de *Salmonella*, en su intento por adaptar las condiciones del hospedador a los intereses de la bacteria. Además, su dimerización y autofosforilación ya crean una diana para una ligasa de ubiquitina propia del hospedador, pero podría suponer la puerta de entrada para la actuación de SlrP en el contexto de una infección de *Salmonella*.

También se encuentra implicado en la organización del citoesqueleto el gen *TBCE*, cuyo producto es el cofactor E de unión a tubulina. TBCE es una proteína que se localiza en la región pericentrosomal de la célula que tiene la capacidad de capturar monómeros de  $\alpha$ -tubulina. La sobreexpresión de TBCE en células provoca la desaparición de la red de microtúbulos (Bhamidipati et al., 2000). TBCE se encuentra estrechamente relacionado con la proteína sustrato de la actividad transferasa de SseK1, TBCB, de la que se ha hablado anteriormente. Y es que ambos cofactores, TBCE y TBCB, forman un complejo a través de la interacción de sus dominios Ubl. Este complejo participa en la regulación de la dinámica de microtúbulos, ya que puede disociar los dímeros de  $\alpha/\beta$ -tubulina (Kortazar et al., 2007). En el clon que se ha detectado de TBCE (**Tabla R.2.1**), el cofactor carece del dominio CAP-Gly de asociación al citoesqueleto, que se encuentra en la región N-terminal. Sin embargo, aunque este dominio sirva para el reconocimiento de otros péptidos, no es necesario para la interacción de TBCE con SlrP. A diferencia de TBCB, en cuya región central se encontraba un dominio CC, TBCE contiene en su región central un gran dominio LRR, que al igual que con otros candidatos, se postula como la secuencia determinante de la interacción con el efector SlrP de *Salmonella*.

El último gen que se incluye en el grupo de organización del citoesqueleto es *MITD1*. En el caso de este gen, su función está específicamente acotada en el proceso de citocinesis. El proceso

de división de dos células hijas está estrictamente regulado para evitar daños en la descendencia o en la carga genética que tengan (Janssen et al., 2011). En este contexto, se produce una reestructuración de los filamentos del citoesqueleto y se reclutan numerosos reguladores del complejo ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*), el principal responsable de que la citocinesis se desarrolle de forma adecuada y finalmente la separación de las dos células hijas (Morita et al., 2007). Entre estos reguladores reclutados se encuentra MITD1, al que se le atribuyen dos funciones específicas: estabilizar el cuerpo intermedio o *midbody* (la fracción de citoplasma o 'puente' intracelular que conecta a dos células en división) y coordinar la abscisión de la membrana con otros procesos anteriores, como la remodelación del citoesqueleto (Hadders et al., 2012; Lee et al., 2012b). En ausencia de MITD1, las células no completan satisfactoriamente la citocinesis por la detención de la abscisión o la inestabilidad del cuerpo intermedio, de modo que pueden acabar produciéndose errores como un incremento en la formación de pequeñas burbujas o ampollas, denominado *blebbing*, por el desacoplamiento del citoesqueleto de la membrana plasmática; también se produce la abscisión prematura de las células en citocinesis (Hadders et al., 2012). Estos rasgos a menudo se identifican con el inicio de la vía apoptótica. Estos hechos son compatibles con la posible acción de SlrP a través de su interacción con MITD1, ya que se ha demostrado anteriormente en nuestro laboratorio que el efector SlrP aumenta la muerte celular cuando es expresado en el hospedador (Bernal-Bayard and Ramos-Morales, 2009).

Además de todos los genes que se han analizado en los diferentes grupos funcionales, se detectó un gen más cuyo producto interactúa con SlrP, pero no se encasilló en ninguno de los grupos anteriores. Este gen es *RABIF*. También conocido como *MSS4*, el producto del gen *RABIF* es una proteína muy conservada a lo largo de la evolución, y se define como un factor de intercambio de nucleótidos (GEF, del inglés *guanine exchange factor*) que interactúa con las GTPasas de la familia Rab (Burton et al., 1994). Como alternativa a su ineficiente actividad como GEF, también se le ha atribuido la función de chaperona de las mismas GTPasas de las proteínas Rab (Wixler et al., 2011). Gracias a esta última función, *RABIF* tiene un papel fundamental en la exocitosis, especialmente del transportador de glucosa GLUT4, cuya expresión se induce mediante insulina y que tiene una gran relevancia en el mantenimiento de la homeostasis celular (Gulbranson et al., 2017).

Dado que SlrP es una enzima E3 del complejo ligasa de ubiquitina, existía la posibilidad de que los productos de los genes encontrados en el escrutinio de doble híbrido con la genoteca de ADNc de células Jurkat pudieran ser utilizados como sustratos por el efector, como ya sucede con la tiorredoxina (Bernal-Bayard and Ramos-Morales, 2009). También cabe la posibilidad de que se produjera una interacción entre ellos pero no se produzca ubiquitilación, al igual que sucede en la relación entre SlrP y la chaperona del retículo endoplásmico ERdj3 (Bernal-Bayard et al., 2010).

Una vez se revisó la interacción en levaduras de todos los candidatos obtenidos en el escrutinio, no se continuó adelante con todos los que ofrecieron un resultado positivo en la interacción, solo con una selección de algunos de ellos. Los criterios para seleccionar un candidato o no para continuar su estudio fueron dos: primero, que se hubieran identificado diferentes clones del mismo candidato; y segundo, que el candidato apareciera en repetidas ocasiones en las interacciones con SlrP (**Tabla R.2.1**). La utilización de estos criterios de

selección (apariciones frecuentes de un mismo gen y con diferentes clones) nos aportó la fiabilidad suficiente como para suponer que esa interacción detectada, además de tener más posibilidades de ser real, era una interacción fuerte. Utilizando estos criterios, las condiciones de los resultados se restringieron para aumentar la credibilidad del escrutinio, dado que la técnica del doble híbrido en levaduras presenta en ocasiones falsos positivos. Aquellos genes cuya interacción con SlrP no se continuó estudiando, perfectamente pueden llegar a ser interacciones reales e incluso sustratos de la actividad ligasa de ubicuitina de SlrP, sin descartar incluso que puedan resultar interesantes para su estudio de cara al futuro. Así, de todos los casos detectados, aquellas interacciones que en principio parecen más estables son las de los casos de los genes *LSM2*, *MITD1*, *PLK4*, *PPP1R7*, *RAB1F* y *SNRPD2*, siendo el producto de este último gen el único de los candidatos que se comportó como sustrato de la actividad ligasa de ubicuitina de SlrP *in vitro* (**Figura R.2.7**).

Se descartó el candidato *XRCC6* desde una etapa muy precoz del escrutinio, ya que a pesar de cumplir los criterios de selección especificados anteriormente, apareció como interacción específica con SseK1 en un escrutinio mediante el sistema de doble híbrido realizado previamente (Araujo-Garrido et al., 2020b) y en otro escrutinio realizado en el laboratorio con SseK3, cuyos datos aún no han sido publicados. Varias interacciones de una misma proteína humana con diferentes efectores de *Salmonella* generan incertidumbre acerca de la especificidad de estas interacciones. *XRCC6* es una proteína capaz de unirse a ADN de doble cadena o dañado, implicada en varias tareas relacionadas con el material genético como desenrollamiento, ligación o reparación de roturas de ADN (Baumann and West, 1998; Featherstone and Jackson, 1999; Tuteja et al., 1994). Por tanto, la aparición de *XRCC6* en todos los escrutinios podría explicarse por la vía de la inespecificidad, dada su elevada capacidad de interaccionar con ADN en diferentes condiciones. De todos modos, la continuación lógica de este trabajo consistirá en la confirmación de las diferentes interacciones detectadas mediante métodos independientes, a través de experimentos de purificación por afinidad o coimmunoprecipitación, de forma análoga al trabajo desarrollado en el Capítulo 1 con el efector SseK1, y posteriormente estudiar con mayor profundidad y en diferentes contextos aquellos sustratos de SlrP que sean confirmados y el efecto que provoca la interacción con el efector de *Salmonella*.

A raíz de las interacciones detectadas de SlrP en el escrutinio de doble híbrido con proteínas nucleares e implicadas en la regulación de genes, también se podría conjeturar que este efector de *Salmonella*, de algún modo, pudiera alterar la expresión de genes en la célula hospedadora. En este contexto encaja el análisis desarrollado en la última parte de este trabajo. La otra estrategia utilizada para el estudio de los efectos de SlrP en la célula hospedadora, desarrollado en el **Capítulo 3** de esta tesis, fue un análisis transcriptómico. Previamente se llevó a cabo en nuestro laboratorio otra aproximación a nivel transcriptómico y proteómico de SlrP y se analizaron los cambios producidos por la expresión estable del efector en células HeLa. En esta Tesis se usó una aproximación distinta que consistió en comparar el transcriptoma de células HeLa infectadas con la estirpe silvestre de *S. Typhimurium* con el de células infectadas con una estirpe mutante para el gen *slrP*. En las condiciones expuestas, la única diferencia entre los dos grupos era exclusivamente la expresión o no de SlrP, por lo que

las variaciones transcriptómicas obtenidas idealmente se explicaron mediante esta diferencia. Sin embargo, no se pueden descartar interferencias por el resto de componentes de la infección por *Salmonella*. De hecho, en varias ocasiones supone un problema el estudio de los efectores secretados por el T3SS, ya que en algunos casos los efectores actúan de forma redundante y en otros tienen funciones totalmente opuestas, por lo que se camuflan (Galán, 2009).

A diferencia del capítulo anterior, en el que se estudiaban interacciones directas de SlrP con proteínas del hospedador, en el caso del estudio de la transcriptómica observamos una expresión diferencial de algunos genes dependiendo de la presencia o no de SlrP (**Tabla R.3.1**). Esto no significa necesariamente que SlrP tenga una actividad directa sobre ellos. Por tanto, el foco debe centrarse en aquellas funciones y procesos en los que estos genes están implicados, información que se obtuvo (**Tablas R.3.2, R.3.3 y R.3.4**) mediante el uso de las diferentes herramientas descritas en los apartados de **Resultados y Materiales y Métodos**.

El análisis de ontología génica nos permitió observar que los genes obtenidos están implicados en procesos muy diversos. Dentro de los genes cuya expresión aumentó por la presencia SlrP, encontramos una inmunoglobulina, *IGKV2D-29*. Esto nos lleva a pensar que SlrP es capaz de algún modo de estimular este tipo de respuesta defensiva por parte del organismo, aunque en la bibliografía existente se describe precisamente una función en el sentido contrario, como la inhibición de la activación del inflammasoma y de la maduración de la IL-1 $\beta$  en ratones (Rao et al., 2017). También aumentan su expresión *PPIAP* y *SFPQ*, asociados con la respuesta celular apoptótica frente a estrés oxidativo. La activación de genes con esta función defensiva se podría explicar mediante la ubicuitalización de Trx1 por parte de SlrP, proceso que disminuye la actividad de la proteína humana (Bernal-Bayard and Ramos-Morales, 2009). Trx1 es muy importante en el mantenimiento del estado redox de la célula, y regula varios procesos fisiológicos en la célula tales como proliferación, desarrollo o apoptosis (Powis and Montfort, 2001); y, por tanto, es esperable que se activaran genes implicados en la respuesta a estrés oxidativo en la célula.

Otro de los genes cuya expresión aumenta en presencia de SlrP es *PPP1R2P*. Este es uno de los varios pseudogenes derivados de *PPP1R2*, de los cuales se propone funcionalidad a algunos a partir de su evolución, en contra de la visión general de los pseudogenes (Korrodi-Gregório et al., 2013). *PPP1R2* se encuentra estrechamente relacionado con uno de los candidatos obtenidos en el escrutinio de doble híbrido, *PPP1R7*; y es que ambos regulan la actividad de la fosfatasa PP1, contribuyendo al normal desarrollo del ciclo celular (Bresch et al., 2020). La posible interferencia de SlrP en las rutas en las que se encuentran implicados estos genes, junto con otras directamente relacionadas, como señalización mTOR, señalización  $\beta$ -adrenérgica, proteínas G o activación de PKA (**Tabla R.3.4**), podría contribuir a que el hospedador tuviera deficiencias en la detección de los problemas que se le presenten durante la infección por *Salmonella*, de modo que el patógeno podría optimizar su entrada al organismo. En cierto modo, éste es un efecto similar al que ya se ha descrito para varios efectores, entre ellos el propio SlrP, que en el transcurso de una infección por *S. Typhimurium* en ratones inhibe la activación del inflammasoma, causada por la señalización mediada por IL-1 $\beta$  (Rao et al., 2017). De este modo, previene el desarrollo de anorexia como mecanismo defensivo del hospedador, contribuyendo a la supervivencia y transmisibilidad de *Salmonella*.

Por otra parte, se observan varios genes con expresión diferencial que afectan a diversas rutas de señalización como NF- $\kappa$ B y MAPK, implicadas en respuestas ante situaciones de estrés y defensivas. Entre ellos se encuentra el ya mencionado *PPIAP*, pero también otros como *PLA2G10* o *LSP1*. La fosfolipasa *PLA2G10*, que mediante su actividad enzimática libera ácidos grasos y fosfolípidos, se ha demostrado que tiene actividad bactericida (Koduri et al., 2002) y se expresa en órganos asociados con la respuesta inmune (Degousee et al., 2002), por lo que el aumento de su expresión frente a SlrP encaja con el desarrollo de más mecanismos defensivos frente a la infección por *Salmonella*. El producto del gen *LSP1* es una proteína asociada al citoesqueleto por su capacidad de unión a F-actina (**Figura R.3.1**). Entre las relaciones más estrechas de *LSP1*, se pueden encontrar varias proteínas implicadas en la señalización MAP (**Figura R.3.3**).

*LSP1*, que se expresa en células específicas del sistema inmune, también regula la quimiotaxia de los neutrófilos durante el proceso de inflamación (Wang et al., 2002) y regula negativamente la migración de leucocitos (Jongstra-Bilen and Jongstra, 2006). Este hecho también enlaza con la capacidad de SlrP para interferir en la capacidad de adhesión entre células y migración celular (Cordero-Alba et al., 2016), encontrándose en este trabajo algunas diferencias de expresión en genes relacionados con la movilidad celular, concretamente con el ya mencionado *LSP1* y también *FMN1*, lo que resulta compatible con la capacidad atribuida al efector de *Salmonella*. En la misma línea que el anterior, *FMN1* interviene en la polimerización de fibras de actina y en formación de uniones adherentes entre células (**Tabla R.3.2**) y, en última instancia, contribuye a la movilidad celular (Dettenhofer et al., 2008).

Como ya se ha comentado en este trabajo, SlrP es una ligasa de ubiquitina y es capaz de etiquetar varias proteínas de la célula hospedadora. Una de las funciones de la ubiquitilación es el marcaje de proteínas para su reconocimiento por el proteosoma y posterior degradación. En este contexto se puede encontrar una relación entre el efecto de SlrP y la variación en la expresión de *USP32P1*. *USP32* tiene actividad desubcutilasa de proteínas, y la expresión del gen que lo codifica tiene que ser estrictamente controlada, ya que su sobreexpresión causa ciertos tipos de cáncer (Akhavantabasi et al., 2010) pero su represión repercute en la proliferación y en la migración celular (Hu et al., 2017).

El efecto que genera la actividad ligasa de ubiquitina de SlrP, sumado a la interacción de este efector con chaperonas del retículo endoplásmico como ERdj3 (Bernal-Bayard et al., 2010), que impide el correcto plegamiento de otras proteínas, podría contribuir a que se produzcan modificaciones en el perfil de proteínas activas en la célula hospedadora. Es en este ámbito donde también puede relacionarse con otro de los genes cuya expresión se ve modificada por SlrP: *HSPA7*. El producto de este gen es una chaperona que colabora en el plegamiento de proteínas. Se ha descrito que diferentes proteínas de la misma familia que *HSPA7* están implicadas en la resistencia a la infección por *Salmonella*, como la resistencia a *S. Enteritidis* en pollos (Soleimani et al., 2012) o *S. Choleraesuis* en macrófagos (Nishimura et al., 1997), debido a su amplia gama de respuestas a diferentes tipos de estrés y a su importancia central en la defensa y supervivencia del hospedador.

En resumen, puede afirmarse que los productos de los genes *HSPA7* y *USP32* intervienen en que las modificaciones postraduccionales de las proteínas desemboquen en un correcto



funcionamiento de éstas. Por tanto, la interferencia por parte de SlrP sobre la expresión de estos genes podría contribuir a un estado más caótico en el hospedador, con desajustes en la degradación y plegamiento de proteínas, que pudiera ser aprovechado por *Salmonella* en el proceso de infección.

A lo largo de esta Tesis hemos intentado profundizar en el estudio de dos efectores secretados por los T3SS de *Salmonella*: SseK1 y SlrP. Respecto al primero de ellos, se han identificado nuevas dianas humanas que interactúan con SseK1, siendo además TBCB un sustrato de su actividad transferasa de N-acetilglucosamina a residuos de arginina. A raíz de este descubrimiento se ha comprobado que SseK1 afecta a los niveles de acetilación de tubulina en la célula hospedadora. Este hecho abre la posibilidad de que se estudie con mayor profundidad la implicación de SseK1, y otras proteínas de su misma familia, en la dinámica de microtúbulos. Finalmente, se han trabajado diferentes enfoques que permitieran identificar con mayor profundidad la implicación de SlrP en el proceso de infección, mediante un escrutinio de doble híbrido en levaduras y un estudio de transcriptómica en células infectadas con diferentes estirpes de *Salmonella*. Se han detectado varias interacciones de SlrP con genes humanos, e incluso un resultado que indica que uno de ellos (SNRPD2) es ubicuitalado por el efector de *Salmonella*; y también variaciones en la expresión génica de genes implicados en diferentes procesos. Quedan ahora por confirmar estas variaciones en las expresiones génicas mediante qRT-PCR, validando los datos obtenidos y posteriormente realizar un análisis más detallado de su situación durante las infecciones con *Salmonella* y su relación con SlrP.



# Conclusiones

---



1. SseK1 interactúa con ZBTB16 y TBCB, siendo además este último sustrato de su actividad transferasa de N-acetilglucosamina.
2. SseK1, al igual que su parólogo SseK3, afecta a los niveles de acetilación de tubulina en la célula hospedadora. Este efecto depende de su actividad catalítica.
3. Mediante el sistema de doble híbrido en levaduras se han detectado catorce proteínas humanas como posibles ligandos de SlrP que sugieren la intervención del efector de *Salmonella* en procesos de regulación génica, procesamiento de ARN y organización del citoesqueleto.
4. SlrP utiliza la proteína humana SNRPD2 como sustrato de su actividad ligasa de ubiquitina.
5. Siete genes están significativamente más expresados y ocho significativamente menos expresados debido a la presencia de SlrP en infecciones de células epiteliales humanas HeLa.



# Bibliografía

---





- Abdallah, A. M., Gey van Pittius, N. C., DiGiuseppe Champion, P. A., Cox, J., Luirink, J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., Appelmelk, B. J. and Bitter, W.** (2007). Type VII secretion - Mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol* **5**, 883–891.
- Abrahams, G. L., Müller, P. and Hensel, M.** (2006). Functional dissection of SseF, a type III effector protein involved in positioning the *Salmonella*-containing vacuole. *Traffic* **7**, 950–965.
- Akeda, Y. and Galán, J. E.** (2005). Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* **437**, 911–915.
- Akhavantabasi, S., Akman, H. B., Sapmaz, A., Keller, J., Petty, E. M. and Erson, A. E.** (2010). USP32 is an active, membrane-bound ubiquitin protease overexpressed in breast cancers. *Mamm Genome* **21**, 388–397.
- Akopyan, K., Edgren, T., Wang-Edgren, H., Rosqvist, R., Fahlgren, A., Wolf-Watz, H. and Fallman, M.** (2011). Translocation of surface-localized effectors in type III secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 1639–1644.
- Akyala, A. I. and Alsam, S.** (2015). Extended Spectrum Beta Lactamase Producing Strains of *Salmonella species* - A Systematic Review. *J Microbiol Res* **5**, 57–70.
- Alemán, A., Rodríguez-Escudero, I., Mallo, G. V., Cid, V. J., Molina, M. and Rotger, R.** (2005). The amino-terminal non-catalytic region of *Salmonella typhimurium* SigD affects actin organization in yeast and mammalian cells. *Cell Microbiol* **7**, 1432–1446.
- Allen, E., Ding, J., Wang, W., Pramanik, S., Chou, J., Yau, V. and Yang, Y.** (2005). Gigaxonin-controlled degradation of MAP1B light chain is critical to neuronal survival. *Nature* **438**, 224–228.
- Altier, C.** (2005). Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *J Microbiol* **43 Spec No**, 85–92.
- Altier, C., Suyemoto, M. and Lawhon, S. D.** (2000). Regulation of *Salmonella enterica* serovar typhimurium invasion genes by *csrA*. *Infect Immun* **68**, 6790–6797.
- Alvarez-Martinez, C. E. and Christie, P. J.** (2009). Biological Diversity of Prokaryotic Type IV Secretion Systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**, 775–808.
- Anderson, J. S. J. and Parker, R.** (1998). The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SK12 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J* **17**, 1497–1506.
- Araujo-Garrido, J. L., Bernal-Bayard, J. and Ramos-Morales, F.** (2020a). Type III Secretion Effectors with Arginine N-Glycosyltransferase Activity. *Microorganisms* **8**, 357.
- Araujo-Garrido, J. L., Baisón-Olmo, F., Bernal-Bayard, J., Romero, F. and Ramos-Morales, F.** (2020b). Tubulin Folding Cofactor TBCB is a Target of the *Salmonella* Effector Protein SseK1. *Int J Mol Sci* **21**,.
- Archambault, V., Lépine, G. and Kachaner, D.** (2015). Understanding the Polo Kinase machine. *Oncogene* **34**, 4799–4807.
- Arnold, R., Brandmaier, S., Kleine, F., Tischler, P., Heinz, E., Behrens, S., Niinikoski, A., Mewes, H. W., Horn, M. and Rattei, T.** (2009). Sequence-Based Prediction of Type III

- Aussel, L., Zhao, W., Hébrard, M., Guilhon, A. A., Viala, J. P. M., Henri, S., Chasson, L., Gorvel, J. P., Barras, F. and Méresse, S.** (2011). *Salmonella* detoxifying enzymes are sufficient to cope with the host oxidative burst. *Mol Microbiol* **80**, 628–640.
- Baek, C. H., Wang, S., Roland, K. L. and Curtiss, R.** (2009). Leucine-responsive regulatory protein (*Lrp*) acts as a virulence repressor in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol* **191**, 1278–1292.
- Baisón-Olmo, F., Galindo-Moreno, M. and Ramos-Morales, F.** (2015). Host cell type-dependent translocation and PhoP-mediated positive regulation of the effector SseK1 of *Salmonella enterica*. *Front Microbiol* **6**, 1–15.
- Bajaj, V., Hwang, C. and Lee, C. A.** (1995). *hilA* is a novel ompR/toxR family member that activates the expression of *Salmonella* typhimurium invasion genes. *Mol Microbiol* **18**, 715–727.
- Bakowski, M. A., Cirulis, J. T., Brown, N. F., Finlay, B. B. and Brumell, J. H.** (2007). SopD acts cooperatively with SopB during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion. *Cell Microbiol* **9**, 2839–2855.
- Bakowski, M. A., Braun, V. and Brumell, J. H.** (2008). *Salmonella*-containing vacuoles: Directing traffic and nesting to grow. *Traffic* **9**, 2022–2031.
- Balbontín, R., Rowley, G., Pucciarelli, M. G., López-Garrido, J., Wormstone, Y., Lucchini, S., García-Del Portillo, F., Hinton, J. C. D. and Casadesús, J.** (2006). DNA adenine methylation regulates virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol* **188**, 8160–8168.
- Baumann, P. and West, S. C.** (1998). DNA end-joining catalyzed by human cell-free extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14066–14070.
- Baumler, A. J. and Heffron, F.** (1995). Identification and sequence analysis of *lpfABCDE*, a putative fimbrial operon of *Salmonella* Typhimurium. *J Bacteriol* **177**, 2087–2097.
- Bäumler, A. J.** (1997). The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*. *Trends Microbiol* **5**, 318–322.
- Bäumler, A. J., Tsolis, R. M., Bowe, F. A., Kusters, J. G., Hoffmann, S. and Heffron, F.** (1996). The *pef* fimbrial operon of *Salmonella typhimurium* mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. *Infect Immun* **64**, 61–68.
- Bäumler, A. J., Tsolis, R. M., Ficht, T. A. and Adams, L. G.** (1998). Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect Immun* **66**, 4579–4587.
- Baxter, M. A. and Jones, B. D.** (2005). The *fimYZ* genes regulate *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion in addition to type 1 fimbrial expression and bacterial motility. *Infect Immun* **73**, 1377–1385.
- Baxter, M. A., Fahlen, T. F., Wilson, R. L. and Jones, B. D.** (2003). HilE interacts with HilD and negatively regulates *hilA* transcription and expression of the *Salmonella enterica* serovar typhimurium invasive phenotype. *Infect Immun* **71**, 1295–1305.

- Bernal-Bayard, J. and Ramos-Morales, F.** (2009). *Salmonella* type III secretion effector SlrP is an E3 ubiquitin ligase for mammalian thioredoxin. *J Biol Chem* **284**, 27587–27595.
- Bernal-Bayard, J., Cardenal-Muñoz, E. and Ramos-Morales, F.** (2010). The *Salmonella* type III secretion effector, *Salmonella* Leucine-rich Repeat Protein (SlrP), targets the human chaperone ERdj3. *J Biol Chem* **285**, 16360–16368.
- Bhamidipati, A., Lewis, S. A. and Cowan, N. J.** (2000). ADP ribosylation factor-like protein 2 (Arl2) regulates the interaction of tubulin-folding cofactor D with native tubulin. *J Cell Biol* **149**, 1087–1096.
- Bierschenk, D., Boucher, D. and Schroder, K.** (2017). *Salmonella*-induced inflammasome activation in humans. *Mol Immunol* **86**, 38–43.
- Bijlsma, J. J. E. and Groisman, E. A.** (2005). The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **57**, 85–96.
- Blanc-Potard, A. B., Solomon, F., Kayser, J. and Groisman, E. A.** (1999). The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* **181**, 998–1004.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., et al.** (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science (80- )* **277**, 1453–1462.
- Blondel, C. J., Jiménez, J. C., Contreras, I. and Santiviago, C. A.** (2009). Comparative genomic analysis uncovers 3 novel loci encoding type six secretion systems differentially distributed in *Salmonella* serotypes. *BMC Genomics* **10**,.
- Boddicker, J. D. and Jones, B. D.** (2004). Lon Protease Activity Causes Down-Regulation of *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Invasion Gene Expression after Infection of Epithelial Cells. *Infect Immun* **72**, 2002–2013.
- Boucrot, E., Henry, T., Borg, J. P., Gorvel, J. P. and Méresse, S.** (2005). The intracellular fate of *Salmonella* depends on the recruitment of kinesin. *Science (80- )* **308**, 1174–1178.
- Bousquet-Antonelli, C., Presutti, C. and Tollervey, D.** (2000). Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover. *Cell* **102**, 765–775.
- Boyd, E. F., Wang, F. S., Whittam, T. S. and Selander, R. K.** (1996). Molecular genetic relationships of the Salmonellae. *Appl Environ Microbiol* **62**, 804–808.
- Boyer, H. W. and Roulland-dussoix, D.** (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **41**, 459–472.
- Boyer, F., Fichant, G., Berthod, J., Vandenbrouck, Y. and Attree, I.** (2009). Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: What can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics* **10**,.
- Boyle, E. C., Brown, N. F. and Finlay, B. B.** (2006). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium effectors SopB, SopE, SopE2 and SipA disrupt tight junction structure and function. *Cell Microbiol* **8**, 1946–1957.
- Bradford, M.** (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* **72**,

248–254.

- Brandtzaeg, P.** (1989). Overview of the mucosal immune system. *Curr Top Microbiol Immunol* **146**, 13–25.
- Braun, V., Wong, A., Landekic, M., Hong, W. J., Grinstein, S. and Brumell, J. H.** (2010). Sorting nexin 3 (SNX3) is a component of a tubular endosomal network induced by *Salmonella* and involved in maturation of the *Salmonella*-containing vacuole. *Cell Microbiol* **12**, 1352–1367.
- Brawn, L. C., Hayward, R. D. and Koronakis, V.** (2007). *Salmonella* SPI1 Effector SipA Persists after Entry and Cooperates with a SPI2 Effector to Regulate Phagosome Maturation and Intracellular Replication. *Cell Host Microbe* **1**, 63–75.
- Breeden, L. and Nasmyth, K.** (1985). Regulation of the yeast HO gene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **50**, 643–650.
- Brennan, M. A. and Cookson, B. T.** (2000). *Salmonella* induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol Microbiol* **38**, 31–40.
- Bresch, A. M., Yerich, N., Wang, R. and Sperry, A. O.** (2020). The PP1 regulator PPP1R2 coordinately regulates AURKA and PP1 to control centrosome phosphorylation and maintain central spindle architecture. *BMC Mol Cell Biol* **21**,.
- Breslow, D. K. and Holland, A. J.** (2019). Mechanism and Regulation of Centriole and Cilium Biogenesis. *Annu Rev Biochem* **88**, 691–724.
- Bronzan, R. N., Taylor, T. E., Mwenechanya, J., Tembo, M., Kayira, K., Bwanaisa, L., Njobvu, A., Kondowe, W., Chalira, C., Walsh, A. L., et al.** (2007). Bacteremia in Malawian children with severe malaria: Prevalence, etiology, HIV coinfection, and outcome. *J Infect Dis* **195**, 895–904.
- Brown, N. F., Vallance, B. A., Coombes, B. K., Valdez, Y., Coburn, B. A. and Finlay, B. B.** (2005). *Salmonella* pathogenicity island 2 is expressed prior to penetrating the intestine. *PLoS Pathog* **1**, 0252–0258.
- Brown, N. F., Coombes, B. K., Bishop, J. L., Wickham, M. E., Lowden, M. J., Gal-Mor, O., Goode, D. L., Boyle, E. C., Sanderson, K. L. and Finlay, B. B.** (2011). *Salmonella* phage ST64B encodes a member of the SseK/NleB effector family. *PLoS One* **6**, e17824.
- Browne, S. H., Lesnick, M. L. and Guiney, D. G.** (2002). Genetic requirements for *Salmonella*-induced cytopathology in human monocyte-derived macrophages. *Infect Immun* **70**, 7126–7135.
- Browne, S. H., Hasegawa, P., Okamoto, S., Fierer, J. and Guiney, D. G.** (2008). Identification of *Salmonella* SPI-2 secretion system components required for SpvB-mediated cytotoxicity in macrophages and virulence in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* **52**, 194–201.
- Broz, P., Newton, K., Lamkanfi, M., Mariathasan, S., Dixit, V. M. and Monack, D. M.** (2010). Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against *Salmonella*. *J Exp Med* **207**, 1745–1755.
- Brumell, J. H., Tang, P., Zaharik, M. L. and Finlay, B. B.** (2002). Disruption of the *Salmonella*-containing vacuole leads to increased replication of *Salmonella enterica* serovar typhimurium in the cytosol of epithelial cells. *Infect Immun* **70**, 3264–3270.

- Brunet, Y. R., Khodr, A., Logger, L., Aussel, L., Mignot, T., Rimsky, S. and Cascales, E.** (2015). H-NS silencing of the salmonella pathogenicity island 6-encoded type VI secretion system limits *Salmonella enterica* serovar typhimurium interbacterial killing. *Infect Immun* **83**, 2738–2750.
- Bruno, V. M., Hannemann, S., Lara-Tejero, M., Flavell, R. A., Kleinstein, S. H. and Galán, J. E.** (2009). *Salmonella* typhimurium type III secretion effectors stimulate innate immune responses in cultured epithelial cells. *PLoS Pathog* **5**,.
- Buchwald, G., Friebel, A., Galán, J. E., Hardt, W. D., Wittinghofer, A. and Scheffzek, K.** (2002). Structural basis for the reversible activation of a Rho protein by the bacterial toxin SopE. *EMBO J* **21**, 3286–3295.
- Buckner, M. M. C., Croxen, M. A., Arena, E. T. and Brett Finlay, B.** (2011). A comprehensive study of the contribution of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SPI2 effectors to bacterial colonization, survival and replication in typhoid fever, macrophage and epithelial cell infection models. *Virulence* **2**,.
- Bujny, M. V., Ewels, P. A., Humphrey, S., Attar, N., Jepson, M. A. and Cullen, P. J.** (2008). Sorting nexin-1 defines an early phase of *Salmonella*-containing vacuole-remodeling during *Salmonella* infection. *J Cell Sci* **121**, 2027–2036.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. and Short, J. M.** (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA E. coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 376–379.
- Bulmer, D. M., Kharraz, L., Grant, A. J., Dean, P., Morgan, F. J. E., Karavolos, M. H., Doble, A. C., McGhie, E. J., Koronakis, V., Daniel, R. A., et al.** (2012). The bacterial cytoskeleton modulates motility, type 3 secretion, and colonization in *Salmonella*. *PLoS Pathog* **8**,.
- Burton, J. L., Burns, M. E., Gatti, E., Augustine, G. J. and De Camilli, P.** (1994). Specific interactions of Mss4 with members of the Rab GTPase subfamily. *EMBO J* **13**, 5547–5558.
- Bustamante, V. H. and Calva, E.** (2014). LeuO, a dormant sentinel for SPI-1? *Mol Microbiol* **91**, 1054–1056.
- Bustamante, V. H., Martínez, L. C., Santana, F. J., Knodler, L. A., Steele-Mortimer, O. and Puente, J. L.** (2008). HlID-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 14591–14596.
- Buttner, D.** (2012). Protein Export According to Schedule: Architecture, Assembly, and Regulation of Type III Secretion Systems from Plant- and Animal-Pathogenic Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**, 262–310.
- Callebaut, C., Blanco, J., Benkirane, N., Krust, B., Jacotot, E., Guichard, G., Seddiki, N., Svab, J., Dam, E., Muller, S., et al.** (1998). Identification of V3 loop-binding proteins as potential receptors implicated in the binding of HIV particles to CD4+ cells. *J Biol Chem* **273**, 21988–21997.
- Cano, D. A., Martínez-Moya, M., Pucciarelli, M. G., Groisman, E. A., Casadesús, J. and García-Del Portillo, F.** (2001). *Salmonella enterica* serovar typhimurium response involved in attenuation of pathogen intracellular proliferation. *Infect Immun* **69**, 6463–6474.
- Carbon, S., Douglass, E., Dunn, N., Good, B., Harris, N. L., Lewis, S. E., Mungall, C. J., Basu, S., Chisholm, R. L., Dodson, R. J., et al.** (2019). The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Res* **47**, D330–D338.

- Cardenal-Muñoz, E., Gutiérrez, G. and Ramos-Morales, F.** (2014). Global impact of *Salmonella* type III secretion effector SteA on host cells. *Biochem Biophys Res Commun* **449**, 419–424.
- Carter, P. B. and Collins, F. M.** (1974). The route of enteric infection in normal mice. *J Exp Med* **139**, 1189–1203.
- Casadesús, J.** (1999). The virulence plasmids of *Salmonella*. *Int Microbiol* **2**, 177–84.
- Cascales, E.** (2008). The type VI secretion toolkit. *EMBO Rep* **9**, 735–741.
- Castanheira, S. and García-del Portillo, F.** (2017). *Salmonella* populations inside host cells. *Front Cell Infect Microbiol* **7**,.
- Catron, D. M., Sylvester, M. D., Lange, Y., Kadekoppala, M., Jones, B. D., Monack, D. M., Falkow, S. and Haldar, K.** (2002). The *Salmonella*-containing vacuole is a major site of intracellular cholesterol accumulation and recruits the GPI-anchored protein CD55. *Cell Microbiol* **4**, 315–328.
- Chakravorty, D., Hansen-Wester, I. and Hensel, M.** (2002). *Salmonella* pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular *Salmonella* from reactive nitrogen intermediates. *J Exp Med* **195**, 1155–1166.
- Chakravorty, D., Rohde, M., Jäger, L., Deiwick, J. and Hensel, M.** (2005). Formation of a novel surface structure encoded by *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *EMBO J* **24**, 2043–2052.
- Chandran Darbari, V. and Waksman, G.** (2015). Structural biology of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Biochem* **84**, 603–629.
- Chang, J., Liu, Y., Zhang, D. D., Zhang, D. J., Wu, C. T., Wang, L. S. and Cui, C. P.** (2010). Hepatopoietin Cn suppresses apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells by up-regulating myeloid cell leukemia-1. *World J Gastroenterol* **16**, 193–200.
- Chekanova, J. A., Dutko, J. A., Mian, I. S. and Belostotsky, D. A.** (2002). *Arabidopsis thaliana* exosome subunit AtRrp4p is a hydrolytic 3'→5' exonuclease containing S1 and KH RNA-binding domains. *Nucleic Acids Res* **30**, 695–700.
- Chen, S., Wang, Z. and Chen, Z.** (1995). Acute promyelocytic leukemia: From clinic to molecular biology. *Stem Cells* **13**, 22–31.
- Chen, L. M., Kaniga, K. and Galán, J. E.** (1996). *Salmonella* spp. are cytotoxic for cultured macrophages. *Mol Microbiol* **21**, 1101–1115.
- Chessa, D., Dorsey, C. W., Winter, M. and Bäuml, A. J.** (2008). Binding specificity of *Salmonella* plasmid-encoded fimbriae assessed by glycomics. *J Biol Chem* **283**, 8118–8124.
- Choi, J., Shin, D., Yoona, H., Kim, J., Lee, C. R., Kim, M., Seok, Y. J. and Ryu, S.** (2010). *Salmonella* pathogenicity island 2 expression negatively controlled by EIIANtr-SsrB interaction is required for *Salmonella* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 20506–20511.
- Choi, H. W., Brooking-Dixon, R., Neupane, S., Lee, C. J., Miao, E. A., Staats, H. F. and Abraham, S. N.** (2013). *Salmonella* Typhimurium Impedes Innate Immunity with a Mast-Cell-Suppressing Protein Tyrosine Phosphatase, SptP. *Immunity* **39**, 1108–1120.

- Christian Perez, J., Latifi, T. and Groisman, E. A.** (2008). Overcoming H-NS-mediated transcriptional silencing of horizontally acquired genes by the PhoP and SlyA proteins in *Salmonella enterica*. *J Biol Chem* **283**, 10773–10783.
- Chu, Y., Gao, S., Wang, T., Yan, J., Xu, G., Li, Y., Niu, H., Huang, R. and Wu, S.** (2016). A novel contribution of spvB to pathogenesis of *Salmonella Typhimurium* by inhibiting autophagy in host cells. *Oncotarget* **7**, 8295–8309.
- Collazo, C. M. and Galán, J. E.** (1997). The invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium* directs the translocation of Sip proteins into the host cell. *Mol Microbiol* **24**, 747–756.
- Coller, J. and Parker, R.** (2004). Eukaryotic mRNA decapping. *Annu Rev Biochem* **73**, 861–890.
- Collier-Hyams, L. S., Zeng, H., Sun, J., Tomlinson, A. D., Bao, Z. Q., Chen, H., Madara, J. L., Orth, K. and Neish, A. S.** (2002). Cutting Edge: *Salmonella* AvrA Effector Inhibits the Key Proinflammatory, Anti-Apoptotic NF- $\kappa$ B Pathway. *J Immunol* **169**, 2846–2850.
- Cookson, B. T. and Brennan, M. A.** (2001). Pro-inflammatory programmed cell death [2]. *Trends Microbiol* **9**, 113–114.
- Coombes, B. K., Wickham, M. E., Lowden, M. J., Brown, N. F. and Finlay, B. B.** (2005). Negative regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 is required for contextual control of virulence during typhoid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17460–17465.
- Cordero-Alba, M. and Ramos-Morales, F.** (2014). Patterns of expression and translocation of the ubiquitin ligase SlrP in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol* **196**, 3912–3922.
- Cordero-Alba, M., García-Gómez, J. J., Aguilera-Herce, J. and Ramos-Morales, F.** (2016). Proteomic insight into the effects of the *Salmonella* ubiquitin ligase SlrP on host cells. *Biochem Biophys Res Commun* **472**, 539–544.
- Cornelis, G. R.** (2006). The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* **4**, 811–825.
- Cornelis, G. R. and Van Gijsegem, F.** (2000). Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol* **54**, 735–774.
- Costa, T. R. D., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M. S., Redzej, A., Trokter, M. and Waksman, G.** (2015). Secretion systems in Gram-negative bacteria: Structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol* **13**, 343–359.
- Costas, M. A. and Rubio, M. F.** (2017). Autophagy. A strategy for cell survival. *Medicina (B Aires)* **77**, 314–320.
- Cott Chubiz, J. E., Golubeva, Y. A., Lin, D., Miller, L. D. and Slauch, J. M.** (2010). FlhZ regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 invasion locus by controlling HilD protein activity in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol* **192**, 6261–6270.
- Crawford, R. W., Rosales-Reyes, R., Ramírez-Aguilar, M. D. L. L., Chapa-Azuela, O., Alpuche-Aranda, C. and Gunn, J. S.** (2010). Gallstones play a significant role in *Salmonella* spp. gallbladder colonization and carriage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 4353–4358.
- Cunha-Ferreira, I., Bento, I., Pimenta-Marques, A., Jana, S. C., Lince-Faria, M., Duarte, P., Borrego-Pinto, J., Gilberto, S., Amado, T., Brito, D., et al.** (2013). Regulation of

autophosphorylation controls PLK4 self-destruction and centriole number. *Curr Biol* **23**, 2245–2254.

- Cvetanovic, M., Rooney, R. J., Garcia, J. J., Toporovskaya, N., Zoghbi, H. Y. and Opal, P.** (2007). The role of LANP and ataxin 1 in E4F-mediated transcriptional repression. *EMBO Rep* **8**, 671–677.
- de Souza Santos, M. and Orth, K.** (2015). Subversion of the cytoskeleton by intracellular bacteria: Lessons from *Listeria*, *Salmonella* and *Vibrio*. *Cell Microbiol* **17**, 164–173.
- De Wit, S., Taelman, H., Van de Perre, P., Rouvroy, D. and Clumeck, N.** (1988). *Salmonella* bacteremia in African patients with human immunodeficiency virus infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **7**, 45–47.
- Degousee, N., Ghomashchi, F., Stefanski, E., Singer, A., Smart, B. P., Borregaard, N., Reithmeier, R., Lindsay, T. F., Lichtenberger, C., Reinisch, W., et al.** (2002). Groups IV, V, and X phospholipases A2s in human neutrophils: role in eicosanoid production and gram-negative bacterial phospholipid hydrolysis. *J Biol Chem* **277**, 5061–73.
- Deiwick, J., Salcedo, S. P., Boucrot, E., Gilliland, S. M., Henry, T., Petermann, N., Waterman, S. R., Gorvel, J. P., Holden, D. W. and Méresse, S.** (2006). The translocated *Salmonella* effector proteins SseF and SseG interact and are required to establish an intracellular replication niche. *Infect Immun* **74**, 6965–6972.
- Delcuve, G. P., Khan, D. H. and Davie, J. R.** (2012). Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: Emerging paradigms from studies with inhibitors. *Clin Epigenetics* **4**,.
- Delwick, J., Nikolaus, T., Erdogan, S. and Hensel, M.** (1999). Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. *Mol Microbiol* **31**, 1759–1773.
- Deng, W., Marshall, N. C., Rowland, J. L., McCoy, J. M., Worrall, L. J., Santos, A. S., Strynadka, N. C. J. and Finlay, B. B.** (2017). Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nat Rev Microbiol* **15**, 323–337.
- Desai, P. T., Porwollik, S., Long, F., Cheng, P., Wollam, A., Clifton, S. W., Weinstock, G. M. and McClelland, M.** (2013). Evolutionary genomics of *Salmonella enterica* subspecies. *MBio* **4**,.
- Desvaux, M., Hébraud, M., Talon, R. and Henderson, I. R.** (2009). Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends Microbiol* **17**, 139–145.
- Dettenhofer, M., Zhou, F. and Leder, P.** (2008). Formin 1-isoform IV deficient cells exhibit defects in cell spreading and focal adhesion formation. *PLoS One* **3**,.
- Dibb-Fuller, M. P., Allen-Vercoe, E., Thorns, C. J. and Woodward, M. J.** (1999). Fimbriae- and flagella-mediated association with and invasion of cultured epithelial cells by *Salmonella enteritidis*. *Microbiology* **145**, 1023–1031.
- Diepold, A. and Armitage, J. P.** (2015). Type III secretion systems: The bacterial flagellum and the injectisome. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **370**,.
- Diepold, A., Amstutz, M., Abel, S., Sorg, I., Jenal, U. and Cornelis, G. R.** (2010). Deciphering the assembly of the *Yersinia* type III secretion injectisome. *EMBO J* **29**, 1928–1940.



- Dillon, S. C., Espinosa, E., Hokamp, K., Ussery, D. W., Casadesús, J. and Dorman, C. J.** (2012). LeuO is a global regulator of gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **85**, 1072–1089.
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U. and Hacker, J.** (2004). Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **2**, 414–424.
- Dorsey, C. W., Laarakker, M. C., Humphries, A. D., Weening, E. H. and Bäumlner, A. J.** (2005). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. *Mol Microbiol* **57**, 196–211.
- Drecktrah, D., Levine-Wilkinson, S., Dam, T., Winfree, S., Knodler, L. A., Schroer, T. A. and Steele-Mortimer, O.** (2008). Dynamic behavior of *Salmonella*-induced membrane tubules in epithelial cells. *Traffic* **9**, 2117–2129.
- Dutta, U., Garg, P. K., Kumar, R. and Tandon, R. K.** (2000). Typhoid carriers among patients with gallstones are at increased risk for carcinoma of the gallbladder. *Am J Gastroenterol* **95**, 784–787.
- Dworkin, M. and Falkow, S.** (2006). *The prokaryotes : a handbook on the biology of bacteria*. Springer.
- Eckmann, L., Smith, J. R., Housley, M. P., Dwinell, M. B. and Kagnoff, M. F.** (2000). Analysis by high density cDNA arrays of altered gene expression in human intestinal epithelial cells in response to infection with the invasive enteric bacteria *Salmonella*. *J Biol Chem* **275**, 14084–14094.
- Edwards, R. A., Olsen, G. J. and Maloy, S. R.** (2002). Comparative genomics of closely related Salmonellae. *Trends Microbiol* **10**, 94–99.
- El Qaidi, S., Chen, K., Halim, A., Siukstaite, L., Rueter, C., Hurtado-Guerrero, R., Clausen, H. and Hardwidge, P. R.** (2017). NleB/SseK effectors from *Citrobacter rodentium*, *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* display distinct differences in host substrate specificity. *J Biol Chem* **292**, 11423–11430.
- El Qaidi, S., Wu, M., Zhu, C. and Hardwidge, P. R.** (2019). *Salmonella*, *E. coli* and *Citrobacter* Type III Secretion System Effector Proteins that Alter Host Innate Immunity. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 205–218. Springer.
- El Qaidi, S., Scott, N. E., Hays, M. P., Geisbrecht, B. V., Watkins, S. and Hardwidge, P. R.** (2020). An intra-bacterial activity for a T3SS effector. *Sci Rep* **10**,.
- Ellermeier, J. R. and Slauch, J. M.** (2007). Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Curr Opin Microbiol* **10**, 24–29.
- Ellermeier, J. R. and Slauch, J. M.** (2008). Fur regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system through HilD. *J Bacteriol* **190**, 476–486.
- Ellermeier, C. D., Ellermeier, J. R. and Slauch, J. M.** (2005). HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator hilA in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **57**, 691–705.
- Elsinghorst, E. A.** (1994). Measurement of invasion by gentamicin resistance. *Methods Enzymol* **236**, 405–420.

- Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M. and Hinton, J. C. D.** (2003). Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **47**, 103–118.
- Espinosa, E. and Casadesús, J.** (2014). Regulation of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 (SPI-1) by the LysR-type regulator LeuO. *Mol Microbiol* **91**, 1057–1069.
- Espósito, D., Günster, R. A., Martino, L., El Omari, K., Wagner, A., Thurston, T. L. M. and Rittinger, K.** (2018). Structural basis for the glycosyltransferase activity of the *Salmonella* effector SseK3. *J Biol Chem* **293**, 5064–5078.
- Eswarappa, S. M., Karnam, G., Nagarajan, A. G., Chakraborty, S. and Chakravorty, D.** (2009). lac repressor is an antivirulence factor of *Salmonella enterica*: Its role in the evolution of virulence in *Salmonella*. *PLoS One* **4**, .
- Evans, M. L. and Chapman, M. R.** (2014). Curli biogenesis: Order out of disorder. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1843**, 1551–1558.
- Fahlen, T. F., Mathur, N. and Jones, B. D.** (2000). Identification and characterization of mutants with increased expression of *hila*, the invasion gene transcriptional activator of *Salmonella typhimurium*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **28**, 25–35.
- Fass, E. and Groisman, E. A.** (2009). Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Curr Opin Microbiol* **12**, 199–204.
- Faucher, S. P., Viau, C., Gros, P. P., Daigle, F. and Le Moual, H.** (2008). The *prpZ* gene cluster encoding eukaryotic-type Ser/Thr protein kinases and phosphatases is repressed by oxidative stress and involved in *Salmonella enterica* serovar Typhi survival in human macrophages. *FEMS Microbiol Lett* **281**, 160–166.
- Featherstone, C. and Jackson, S. P.** (1999). Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions? *Mutat Res - DNA Repair* **434**, 3–15.
- Feng, X., Oropeza, R. and Kenney, L. J.** (2003). Dual regulation by phospho-OmpR of *ssrA/B* gene expression in *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* **48**, 1131–1143.
- Ferreira, M., Beullens, M., Bollen, M. and Van Eynde, A.** (2019). Functions and therapeutic potential of protein phosphatase 1: Insights from mouse genetics. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1866**, 16–30.
- Figueira, R. and Holden, D. W.** (2012). Functions of the *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors. *Microbiology* **158**, 1147–1161.
- Figueroa-Bossi, N., Uzzau, S., Maloriol, D. and Bossi, L.** (2001). Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. *Mol Microbiol* **39**, 260–272.
- Filipowicz, W. and Pogači, V.** (2002). Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 319–327.
- Filloux, A., Hachani, A. and Bleves, S.** (2008). The bacterial type VI secretion machine: Yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology* **154**, 1570–1583.
- Fink, S. L. and Cookson, B. T.** (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* **73**, 1907–1916.

- Fink, S. L. and Cookson, B. T.** (2007). Pyroptosis and host cell death responses during *Salmonella* infection. *Cell Microbiol* **9**, 2562–2570.
- Folkesson, A., Löfdahl, S. and Normark, S.** (2002). The *Salmonella enterica* subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel protein families present in bacteria living in close contact with eukaryotic cells. *Res Microbiol* **153**, 537–545.
- Fortune, D. R., Suyemoto, M. and Altier, C.** (2006). Identification of CsrC and characterization of its role in epithelial cell invasion in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect Immun* **74**, 331–339.
- Fox, A. H., Liew, C., Holmes, M., Kowalski, K., Mackay, J. and Crossley, M.** (1999). Transcriptional cofactors of the FOG family interact with GATA proteins by means of multiple zinc fingers. *EMBO J* **18**, 2812–2822.
- Franchi, L., Amer, A., Body-Malapel, M., Kanneganti, T. D., Özören, N., Jagirdar, R., Inohara, N., Vandenabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., et al.** (2006). Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1 $\beta$  in *Salmonella*-infected macrophages. *Nat Immunol* **7**, 576–582.
- Francis, C. L., Ryan, T. A., Jones, B. D., Smith, S. J. and Falkow, S.** (1993). Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature* **364**, 639–642.
- Friebel, A., Ilchmann, H., Aepfelbacher, M., Ehrbar, K., Machleidt, W. and Hardt, W. D.** (2001). SopE and SopE2 from *Salmonella typhimurium* Activate Different Sets of RhoGTPases of the Host Cell. *J Biol Chem* **276**, 34035–34040.
- Fronzes, R., Christie, P. J. and Waksman, G.** (2009). The structural biology of type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* **7**, 703–714.
- Fu, Y. and Galán, J. E.** (1998). Identification of a specific chaperone for SptP, a substrate of the centisome 63 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **180**, 3393–3399.
- Fu, Y. and Galán, J. E.** (1999). A *Salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature* **401**, 293–297.
- Fuentes, J. A., Villagra, N., Castillo-Ruiz, M. and Mora, G. C.** (2008). The *Salmonella typhi* hlyE gene plays a role in invasion of cultured epithelial cells and its functional transfer to *S. Typhimurium* promotes deep organ infection in mice. *Res Microbiol* **159**, 279–287.
- Galán, J. E.** (1996). Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol Microbiol* **20**, 263–271.
- Galán, J. E.** (1999). Interaction of *Salmonella* with host cells through the centisome 63 type III secretion system. *Curr Opin Microbiol* **2**, 46–50.
- Galán, J. E.** (2001). *Salmonella* interactions with host cells: Type III secretion at work. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, pp. 53–86. Annu Rev Cell Dev Biol.
- Galán, J. E.** (2009). Common Themes in the Design and Function of Bacterial Effectors. *Cell Host Microbe* **5**, 571–579.
- Galán, J. E. and Wolf-Watz, H.** (2006). Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**, 567–573.

- Galán, J. E. and Zhou, D.** (2000). Striking a balance: Modulation of the actin cytoskeleton by *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8754–8761.
- Galán, J. E., Lara-Tejero, M., Marlovits, T. C. and Wagner, S.** (2014). Bacterial type III secretion systems: Specialized nanomachines for protein delivery into target cells. *Annu Rev Microbiol* **68**, 415–438.
- Galyov, E. E., Wood, M. W., Rosqvist, R., Mullan, P. B., Watson, P. R., Hedges, S. and Wallis, T. S.** (1997). A secreted effector protein of *Salmonella dublin* is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa. *Mol Microbiol* **25**, 903–912.
- Gan, J., Scott, N. E., Newson, J. P. M., Wibawa, R. R., Wong Fok Lung, T., Pollock, G. L., Ng, G. Z., van Driel, I., Pearson, J. S., Hartland, E. L., et al.** (2020). The *Salmonella* Effector SseK3 Targets Small Rab GTPases. *Front Cell Infect Microbiol* **10**, 419.
- Ganesan, R., Hos, N. J., Gutierrez, S., Fischer, J., Stepek, J. M., Daglidu, E., Krönke, M. and Robinson, N.** (2017). *Salmonella* Typhimurium disrupts Sirt1/AMPK checkpoint control of mTOR to impair autophagy. *PLoS Pathog* **13**,.
- Gao, X., Wang, X., Pham, T. H., Feuerbacher, L. A., Lubos, M. L., Huang, M., Olsen, R., Mushegian, A., Slawson, C. and Hardwidge, P. R.** (2013). NleB, a bacterial effector with glycosyltransferase activity, targets GADPH function to inhibit NF-κB activation. *Cell Host Microbe* **13**, 87–99.
- Gao, X., Pham, T. H., Feuerbacher, L. A., Chen, K., Hays, M. P., Singh, G., Rueter, C., Hurtado-Guerrero, R. and Hardwidge, P. R.** (2016). *Citrobacter rodentium* NleB Protein inhibits tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 3 (TRAF3) ubiquitination to reduce host type I interferon production. *J Biol Chem* **291**, 18232–18238.
- Garai, P., Gnanadhas, D. P. and Chakravorty, D.** (2012). *Salmonella enterica* serovars typhimurium and typhi as model organisms: Revealing paradigm of host-pathogen interactions. *Virulence* **3**, 377–388.
- Garcia-del Portillo, F., Zwick, M. B., Ka Yin Leung and Finlay, B. B.** (1993). *Salmonella* induces the formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10544–10548.
- García-Del Portillo, F., Pucciarelli, M. G. and Casadesús, J.** (1999). DNA adenine methylase mutants of *Salmonella typhimurium* show defects in protein secretion, cell invasion, and M cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11578–11583.
- Gawarzewski, I., Smits, S. H. J., Schmitt, L. and Jose, J.** (2013). Structural comparison of the transport units of type v secretion systems. *Biol Chem* **394**, 1385–1398.
- Geddes, K., Cruz, F. and Heffron, F.** (2007). Analysis of cells targeted by *Salmonella* type III secretion in vivo. *PLoS Pathog* **3**, 2017–2028.
- Gerlach, R. G. and Hensel, M.** (2007). Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol* **297**, 401–415.
- Gerlach, R. G., Jäckel, D., Stecher, B., Wagner, C., Lupas, A., Hardt, W. D. and Hensel, M.** (2007). *Salmonella* Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system. *Cell Microbiol* **9**, 1834–1850.

- Gerlach, R. G., Cláudio, N., Rohde, M., Jäckel, D., Wagner, C. and Hensel, M.** (2008). Cooperation of *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 4 is required to breach epithelial barriers. *Cell Microbiol* **10**, 2364–2376.
- Giacomodonato, M. N., Uzzau, S., Bacciu, D., Caccuri, R., Sarnacki, S. H., Rubino, S. and Cerquetti, M. C.** (2007). SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 effector proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium are synthesized at late stages of infection in mice. *Microbiology* **153**, 1221–1228.
- Goedecke, W., Eijpe, M., Offenber, H. H., Van Aalderen, M. and Heyting, C.** (1999). Mre11 and Ku70 interact in somatic cells, but are differentially expressed in early meiosis. *Nat Genet* **23**, 194–198.
- Gold, V. A. M., Duong, F. and Collinson, I.** (2007). Structure and function of the bacterial Sec translocon (Review). *Mol Membr Biol* **24**, 387–394.
- Golubeva, Y. A., Sadik, A. Y., Ellermeier, J. R. and Slauch, J. M.** (2012). Integrating global regulatory input into the *Salmonella* pathogenicity Island 1 type III secretion system. *Genetics* **190**, 79–90.
- Golubeva, Y. A., Ellermeier, J. R., Chubiz, J. E. C. and Slauch, J. M.** (2016). Intestinal long-chain fatty acids act as a direct signal to modulate expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system. *MBio* **7**,.
- Gong, Y., Sun, L., Zheng, M., Wang, W., Li, S., Xue, J., Hu, S., Huang, Y., Zhang, Q., Yi, X., et al.** (2020). Arg-GlcNAcylation on TRADD by NleB and SseK1 Is Crucial for Bacterial Pathogenesis. *Front Cell Dev Biol* **8**, 641.
- Gonzalo-Asensio, J., Ortega, Á. D., Rico-Pérez, G., Pucciarelli, M. G. and García-del Portillo, F.** (2013). A novel antisense RNA from the *Salmonella* virulence plasmid pSLT expressed by non-growing bacteria inside eukaryotic cells. *PLoS One* **8**,.
- Green, E. R. and Meccas, J.** (2016). Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiol Spectr* **4**,.
- Gregory, G. D., Miccio, A., Bersenev, A., Wang, Y., Hong, W., Zhang, Z., Poncz, M., Tong, W. and Blobel, G. A.** (2010). FOG1 requires NuRD to promote hematopoiesis and maintain lineage fidelity within the megakaryocytic-erythroid compartment. *Blood* **115**, 2156–2166.
- Grimont, F., Lejay-Collin, M., Talukder, K. A., Carle, I., Issenhuth, S., Le Roux, K. and Grimont, P. A. D.** (2007). Identification of a group of *Shigella*-like isolates as *Shigella boydii* 20. *J Med Microbiol* **56**, 749–754.
- Groisman, E. A.** (2001). The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol* **183**, 1835–1842.
- Groisman, E. A. and Ochman, H.** (1994). How to become a pathogen. *Trends Microbiol* **2**, 289–294.
- Groisman, E. A. and Ochman, H.** (1997). How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol* **5**, 343–349.
- Grund, S. and Weber, A.** (1988). A New Type of Fimbriae on *Salmonella typhimurium*. *J Vet Med Ser B* **35**, 779–782.

- Gu, S., Shevchik, V. E., Shaw, R., Pickersgill, R. W. and Garnett, J. A.** (2017). The role of intrinsic disorder and dynamics in the assembly and function of the type II secretion system. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* **1865**, 1255–1266.
- Guiney, D. G.** (2005). The role of host cell death in *Salmonella* infections. *Curr Top Microbiol Immunol* **289**, 131–150.
- Guiney, D. G. and Fierer, J.** (2011). The role of the *spv* genes in *Salmonella* pathogenesis. *Front Microbiol* **2**,.
- Gulbranson, D. R., Davis, E. M., Demmitt, B. A., Ouyang, Y., Ye, Y., Yu, H. and Shen, J.** (2017). RABIF/MSS4 is a Rab-stabilizing holdase chaperone required for GLUT4 exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E8224–E8233.
- Gulig, P. A., Danbara, H., Guiney, D. G., Lax, A. J., Norel, F. and Rhen, M.** (1993). Molecular analysis of *spv* virulence genes of the salmonella virulence plasmids. *Mol Microbiol* **7**, 825–830.
- Gunn, J. S., Alpuche-Aranda, C. M., Loomis, W. P., Belden, W. J. and Miller, S. I.** (1995). Characterization of the *Salmonella typhimurium* *pagC/pagD* chromosomal region. *J Bacteriol* **177**, 5040–5047.
- Günster, R. A., Matthews, S. A., Holden, D. W. and Thurston, T. L. M.** (2017). SseK1 and SseK3 T3SS effectors inhibit NF- $\kappa$ B signalling and necroptotic cell death in *Salmonella*-infected macrophages. *Infect Immun* IAI.00010-17.
- Habedanck, R., Stierhof, Y. D., Wilkinson, C. J. and Nigg, E. A.** (2005). The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication. *Nat Cell Biol* **7**, 1140–1146.
- Habyarimana, F., Sabag-Daigle, A. and Ahmer, B. M. M.** (2014). The SdiA-regulated gene *srgE* encodes a type III secreted effector. *J Bacteriol* **196**, 2301–2312.
- Hacker, J. and Kaper, J. B.** (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* **54**, 641–679.
- Hadders, M. A., Agromayor, M., Obita, T., Perisic, O., Caballe, A., Kloc, M., Lamers, M. H., Williams, R. L. and Martin-Serrano, J.** (2012). ESCRT-III binding protein MITD1 is involved in cytokinesis and has an unanticipated PLD fold that binds membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 17424–17429.
- Hallstrom, K. N. and McCormick, B. A.** (2016). The type three secreted effector SipC regulates the trafficking of PERP during *Salmonella* infection. *Gut Microbes* **7**, 136–145.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557–580.
- Hansen-Wester, I. and Hensel, M.** (2001). *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect* **3**, 549–559.
- Hansmeier, N., Miskiewicz, K., Elpers, L., Liss, V., Hensel, M. and Sterzenbach, T.** (2017). Functional expression of the entire adhesiome of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Sci Rep* **7**,.
- Haraga, A. and Miller, S. I.** (2003). A *Salmonella enterica* serovar Typhimurium translocated leucine-rich repeat effector protein inhibits NF- $\kappa$ B-dependent gene expression. *Infect*

*Immun* **71**, 4052–4058.

- Haraga, A. and Miller, S. I.** (2006). A *Salmonella* type III secretion effector interacts with the mammalian serine/threonine protein kinase PKN1. *Cell Microbiol* **8**, 837–846.
- Haraga, A., Ohlson, M. B. and Miller, S. I.** (2008). *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol* **6**, 53–66.
- Hardie, D. G., Ross, F. A. and Hawley, S. A.** (2012). AMPK: A nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 251–262.
- Hardt, W. D., Chen, L. M., Schuebel, K. E., Bustelo, X. R. and Galán, J. E.** (1998). *S. typhimurium* Encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* **93**, 815–826.
- Hautefort, I., Thompson, A., Eriksson-Ygberg, S., Parker, M. L., Lucchini, S., Danino, V., Bongaerts, R. J. M., Ahmad, N., Rhen, M. and Hinton, J. C. D.** (2008). During infection of epithelial cells *Salmonella enterica* serovar Typhimurium undergoes a time-dependent transcriptional adaptation that results in simultaneous expression of three type 3 secretion systems. *Cell Microbiol* **10**, 958–984.
- Hayward, R. D. and Koronakis, V.** (2002). Direct modulation of the host cell cytoskeleton by *Salmonella* actin-binding proteins. *Trends Cell Biol* **12**, 15–20.
- Hayward, R. D., Cain, R. J., McGhie, E. J., Phillips, N., Garner, M. J. and Koronakis, V.** (2005). Cholesterol binding by the bacterial type III translocon is essential for virulence effector delivery into mammalian cells. *Mol Microbiol* **56**, 590–603.
- Henderson, I. R. and Nataro, J. P.** (2001). Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* **69**, 1231–1243.
- Henry, T., Couillault, C., Rockenfeller, P., Boucrot, E., Dumont, A., Schroeder, N., Hermant, A., Knodler, L. A., Lecine, P., Steele-Mortimer, O., et al.** (2006). The *Salmonella* effector protein PipB2 is a linker for kinesin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13497–13502.
- Hensel, M., Hinsley, A. P., Nikolaus, T., Sawers, G. and Berks, B. C.** (1999). The genetic basis of tetrathionate respiration in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **32**, 275–287.
- Heroes, E., Lesage, B., Görnemann, J., Beullens, M., Van Meervelt, L. and Bollen, M.** (2013). The PP1 binding code: A molecular-lego strategy that governs specificity. *FEBS J* **280**, 584–595.
- Hersh, D., Monack, D. M., Smith, M. R., Ghori, N., Falkow, S. and Zychlinsky, A.** (1999). The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2396–2401.
- Hirota, K.** (2020). Basic biology of hypoxic responses mediated by the transcription factor HIFs and its implication for medicine. *Biomedicines* **8**,
- Ho, T. D. and Starnbach, M. N.** (2005). The *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-encoded type III secretion systems can translocate *Chlamydia trachomatis* proteins into the cytosol of host cells. *Infect Immun* **73**, 905–911.
- Ho, B. T., Dong, T. G. and Mekalanos, J. J.** (2014). A view to a kill: The bacterial type VI secretion system. *Cell Host Microbe* **15**, 9–21.

- Hobbie, S., Chen, L. M., Davis, R. J. and Galán, J. E.** (1997). Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells. *J Immunol* **159**, 5550–9.
- Hoffmann, C., Galle, M., Dilling, S., Käppeli, R., Müller, A. J., Songhet, P., Beyaert, R. and Hardt, W. D.** (2010). In macrophages, caspase-1 activation by SopE and the type III secretion system-1 of *S. Typhimurium* can proceed in the absence of flagellin. *PLoS One* **5**,.
- Holland, A. J., Lan, W., Niessen, S., Hoover, H. and Cleveland, D. W.** (2010). Polo-like kinase 4 kinase activity limits centrosome overduplication by autoregulating its own stability. *J Cell Biol* **188**, 191–8.
- Hołówka, J. and Zakrzewska-Czerwińska, J.** (2020). Nucleoid Associated Proteins: The Small Organizers That Help to Cope With Stress. *Front Microbiol* **11**,.
- Hong, W., Nakazawa, M., Chen, Y. Y., Kori, R., Vakoc, C. R., Rakowski, C. and Blobel, G. A.** (2005). FOG-1 recruits the NuRD repressor complex to mediate transcriptional repression by GATA-1. *EMBO J* **24**, 2367–2378.
- Hospenthal, M. K., Costa, T. R. D. and Waksman, G.** (2017). A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* **15**, 365–379.
- Hu, W., Wei, H., Li, K., Li, P., Lin, J. and Feng, R.** (2017). Downregulation of USP32 inhibits cell proliferation, migration and invasion in human small cell lung cancer. *Cell Prolif* **50**,.
- Hume, P. J., Singh, V., Davidson, A. C. and Koronakis, V.** (2017). Swiss army pathogen: The *Salmonella* entry toolkit. *Front Cell Infect Microbiol* **7**,.
- Humphreys, D., Hume, P. J. and Koronakis, V.** (2009). The *Salmonella* Effector SptP Dephosphorylates Host AAA+ ATPase VCP to Promote Development of its Intracellular Replicative Niche. *Cell Host Microbe* **5**, 225–233.
- Humphreys, D., Davidson, A., Hume, P. J. and Koronakis, V.** (2012). *Salmonella* virulence effector SopE and host GEF ARNO cooperate to recruit and activate WAVE to trigger bacterial invasion. *Cell Host Microbe* **11**, 129–139.
- Humphries, A. D., Townsend, S. M., Kingsley, R. A., Nicholson, T. L., Tsois, R. M. and Bäuml, A. J.** (2001). Role of fimbriae as antigens and intestinal colonization factors of *Salmonella* serovars. *FEMS Microbiol Lett* **201**, 121–5.
- Hurley, D., McCusker, M. P., Fanning, S. and Martins, M.** (2014). *Salmonella*-host interactions - modulation of the host innate immune system. *Front Immunol* **5**,.
- Hutzinger, R., Feederle, R., Mrazek, J., Schiefermeier, N., Balwierz, P. J., Zavolan, M., Polacek, N., Delecluse, H. J. and Hüttenhofer, A.** (2009). Expression and processing of a small nucleolar RNA from the Epstein-Barr virus genome. *PLoS Pathog* **5**,.
- Ibarra, J. A., Knodler, L. A., Sturdevant, D. E., Virtaneva, K., Carmody, A. B., Fischer, E. R., Porcella, S. F. and Steele-Mortimer, O.** (2010). Induction of *Salmonella* pathogenicity island 1 under different growth conditions can affect *Salmonella*-host cell interactions *in vitro*. *Microbiology* **156**, 1120–1133.
- Ilyas, B., Tsai, C. N. and Coombes, B. K.** (2017). Evolution of *Salmonella*-host cell interactions through a dynamic bacterial genome. *Front Cell Infect Microbiol* **7**,.



- Imai, S. ichiro and Guarente, L.** (2014). NAD<sup>+</sup> and sirtuins in aging and disease. *Trends Cell Biol* **24**, 464–471.
- Immerseel, F., Eeckhaut, V., Boyen, F., Pasmans, F., Haesebrouck, F. and Ducatelle, R.** (2008). Mutations influencing expression of the *Salmonella enterica* serovar Enteritidis pathogenicity island I key regulator *hilA*. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol* **94**, 455–461.
- Ingebritsen, T. S., Stewart, A. A. and Cohen, P.** (1983). The Protein Phosphatases Involved in Cellular Regulation: 6. Measurement of Type-1 and Type-2 Protein Phosphatases in Extracts of Mammalian Tissues; an Assessment of Their Physiological Roles. *Eur J Biochem* **132**, 297–307.
- Janssen, R., Van Der Straaten, T., Van Diepen, A. and Van Dissel, J. T.** (2003). Responses to reactive oxygen intermediates and virulence of *Salmonella typhimurium*. *Microbes Infect* **5**, 527–534.
- Janssen, A., van der Burg, M., Szuhai, K., Kops, G. J. P. L. and Medema, R. H.** (2011). Chromosome Segregation Errors as a Cause of DNA Damage and Structural Chromosome Aberrations. *Science (80- )* **333**, 1895–1898.
- Jaslow, S. L., Gibbs, K. D., Fricke, W. F., Wang, L., Pittman, K. J., Mammel, M. K., Thaden, J. T., Fowler, V. G., Hammer, G. E., Elfenbein, J. R., et al.** (2018). *Salmonella* Activation of STAT3 Signaling by SarA Effector Promotes Intracellular Replication and Production of IL-10. *Cell Rep* **23**, 3525–3536.
- Jennings, E., Thurston, T. L. M. and Holden, D. W.** (2017). *Salmonella* SPI-2 Type III Secretion System Effectors: Molecular Mechanisms And Physiological Consequences. *Cell Host Microbe* **22**, 217–231.
- Jepson, M. A., Kenny, B. and Leard, A. D.** (2001). Role of *sipA* in the early stages of *Salmonella typhimurium* entry into epithelial cells. *Cell Microbiol* **3**, 417–426.
- Jolly, C., Winfree, S., Hansen, B. and Steele-Mortimer, O.** (2014). The Annexin A2/p11 complex is required for efficient invasion of *Salmonella Typhimurium* in epithelial cells. *Cell Microbiol* **16**, 64–77.
- Jones, B. D.** (2005). *Salmonella* invasion gene regulation: a story of environmental awareness. *J Microbiol* **43 Spec No**, 110–7.
- Jones, M. A., Wood, M. W., Mullan, P. B., Watson, P. R., Wallis, T. S. and Galyov, E. E.** (1998). Secreted effector proteins of *Salmonella dublin* act in concert to induce enteritis. *Infect Immun* **66**, 5799–5804.
- Jongstra-Bilen, J. and Jongstra, J.** (2006). Leukocyte-specific protein 1 (LSP1): A regulator of leukocyte emigration in inflammation. *Immunol Res* **35**, 65–73.
- Kadkol, S. S., Brody, J. R., Epstein, J. I., Kuhajda, F. P. and Pasternack, G. R.** (1998). Novel nuclear phosphoprotein pp32 is highly expressed in intermediate- and high-grade prostate cancer. *Prostate* **34**, 231–237.
- Kelly, A., Goldberg, M. D., Carroll, R. K., Danino, V., Hinton, J. C. D. and Dorman, C. J.** (2004). A global role for Fis in the transcriptional control of metabolism and type III secretion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology* **150**, 2037–2053.

- Kelly, M., Hart, E., Mundy, R., Marchès, O., Wiles, S., Badea, L., Luck, S., Tauschek, M., Frankel, G., Robins-Browne, R. M., et al.** (2006). Essential role of the type III secretion system effector NleB in colonization of mice by *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun* **74**, 2328–2337.
- Kelly, B. G., Vespermann, A. and Bolton, D. J.** (2009). The role of horizontal gene transfer in the evolution of selected foodborne bacterial pathogens. *Food Chem Toxicol* **47**, 951–968.
- Kim, J. M., Eckmann, L., Savidge, T. C., Lowe, D. C., Witthöft, T. and Kagnoff, M. F.** (1998). Apoptosis of human intestinal epithelial cells after bacterial invasion. *J Clin Invest* **102**, 1815–1823.
- Kingsley, R. A., Van Amsterdam, K., Kramer, N. and Bäumlner, A. J.** (2000). The *shdA* gene is restricted to serotypes of *Salmonella enterica* subspecies I and contributes to efficient and prolonged fecal shedding. *Infect Immun* **68**, 2720–2727.
- Kingsley, R. A., Santos, R. L., Keestra, A. M., Adams, L. G. and Bäumlner, A. J.** (2002). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ShdA is an outer membrane fibronectin-binding protein that is expressed in the intestine. *Mol Microbiol* **43**, 895–905.
- Kiss, T., Morgan, E. and Nagy, G.** (2007). Contribution of SPI-4 genes to the virulence of *Salmonella enterica*. *FEMS Microbiol Lett* **275**, 153–159.
- Knodler, L. A.** (2015). *Salmonella enterica*: Living a double life in epithelial cells. *Curr Opin Microbiol* **23**, 23–31.
- Knodler, L. A. and Steele-Mortimer, O.** (2005). The *Salmonella* effector PipB2 affects late endosome/lysosome distribution to mediate sif extension. *Mol Biol Cell* **16**, 4108–4123.
- Knodler, L. A., Celli, J., Hardt, W. D., Vallance, B. A., Yip, C. and Finlay, B. B.** (2002). *Salmonella* effectors within a single pathogenicity island are differentially expressed and translocated by separate type III secretion systems. *Mol Microbiol* **43**, 1089–1103.
- Knodler, L. A., Finlay, B. and Steele-Mortimer, O.** (2005). The *Salmonella* effector protein SopB protects epithelial cells from apoptosis by sustained activation of Akt. *J Biol Chem* **280**, 9058–9064.
- Knodler, L. A., Vallance, B. A., Celli, J., Winfree, S., Hansen, B., Montero, M. and Steele-Mortimer, O.** (2010). Dissemination of invasive *Salmonella* via bacterial-induced extrusion of mucosal epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 17733–17738.
- Kobe, B. and Kajava, A. V.** (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* **11**, 725–732.
- Koduri, R. S., Grönroos, J. O., Laine, V. J. O., Le Calvez, C., Lambeau, G., Nevalainen, T. J. and Gelb, M. H.** (2002). Bactericidal properties of human and murine groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A(2). *J Biol Chem* **277**, 5849–57.
- Kohlmaier, G., Lončarek, J., Meng, X., McEwen, B. F., Mogensen, M. M., Spektor, A., Dynlacht, B. D., Khodjakov, A. and Gönczy, P.** (2009). Overly Long Centrioles and Defective Cell Division upon Excess of the SAS-4-Related Protein CPAP. *Curr Biol* **19**, 1012–1018.
- Kolesnichenko, M. and Vogt, P. K.** (2011). Understanding PLZF. *Cell Cycle* **10**, 771–775.

- Koronakis, V., Hughes, C. and Koronakis, E.** (1991). Energetically distinct early and late stages of HlyB/HlyD-dependent secretion across both *Escherichia coli* membranes. *EMBO J* **10**, 3263–72.
- Korotkov, K. V., Sandkvist, M. and Hol, W. G. J.** (2012). The type II secretion system: Biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat Rev Microbiol* **10**, 336–351.
- Korrodi-Gregório, L., Abrantes, J., Muller, T., Melo-Ferreira, J., Marcus, K., Da Cruz E Silva, O. A. B., Fardilha, M. and Esteves, P. J.** (2013). Not so pseudo: The evolutionary history of protein phosphatase 1 regulatory subunit 2 and related pseudogenes. *BMC Evol Biol* **13**,.
- Kortazar, D., Fanarraga, M. L., Carranza, G., Bellido, J., Villegas, J. C., Avila, J. and Zabala, J. C.** (2007). Role of cofactors B (TBCB) and E (TBCE) in tubulin heterodimer dissociation. *Exp Cell Res* **313**, 425–36.
- Kubori, T. and Nagai, H.** (2016). The Type IVB secretion system: An enigmatic chimera. *Curr Opin Microbiol* **29**, 22–29.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galán, J. E. and Aizawa, S. I.** (1998). Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science (80- )* **280**, 602–605.
- Kuh, G. F., Stockmann, M., Meyer-Ohlendorf, M., Linta, L., Proepper, C., Ludolph, A. C., Bockmann, J., Boeckers, T. M. and Liebau, S.** (2012). Tubulin-binding cofactor B is a direct interaction partner of the dynactin subunit p150. *Cell Tissue Res* **350**, 13–26.
- Kuhle, V., Jäckel, D. and Hensel, M.** (2004). Effector proteins encoded by *Salmonella* Pathogenicity Island 2 interfere with the microtubule cytoskeleton after translocation into host cells. *Traffic* **5**, 356–370.
- Kujat Choy, S. L., Boyle, E. C., Gal-Mor, O., Goode, D. L., Valdez, Y., Vallance, B. A. and Brett Finlay, B.** (2004). SseK1 and SseK2 Are Novel Translocated Proteins of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Infect Immun* **72**, 5115–5125.
- Kumar, G. S., Gokhan, E., De Munter, S., Bollen, M., Vagnarelli, P., Peti, W. and Page, R.** (2016). The Ki-67 and RepoMan mitotic phosphatases assemble via an identical, yet novel mechanism. *Elife* **5**,.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–5.
- Lai, C. W., Chan, R. C., Cheng, A. F., Sung, J. Y. and Leung, J. W.** (1992). Common bile duct stones: a cause of chronic salmonellosis. *Am J Gastroenterol* **87**, 1198–9.
- Lalitha, M. K. and John, R.** (1994). Unusual manifestations of salmonellosis--a surgical problem. *Q J Med* **87**, 301–9.
- Lambert, M. A. and Smith, S. G. J.** (2008). The PagN protein of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is an adhesin and invasin. *BMC Microbiol* **8**,.
- Lasica, A. M., Ksiazek, M., Madej, M. and Potempa, J.** (2017). The Type IX Secretion System (T9SS): Highlights and Recent Insights into Its Structure and Function. *Front Cell Infect Microbiol* **7**,.
- Latasa, C., Roux, A., Toledo-Arana, A., Ghigo, J. M., Gamazo, C., Penadés, J. R. and Lasa, I.**

- (2005). BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Mol Microbiol* **58**, 1322–1339.
- Lawhon, S. D., Khare, S., Rossetti, C. A., Everts, R. E., Galindo, C. L., Luciano, S. A., Figueiredo, J. F., Nunes, J. E. S., Gull, T., Davidson, G. S., et al.** (2011). Role of SPI-1 secreted effectors in acute bovine response to *Salmonella enterica* serovar typhimurium: A systems biology analysis approach. *PLoS One* **6**.
- Lawley, T. D., Chan, K., Thompson, L. J., Kim, C. C., Govoni, G. R. and Monack, D. M.** (2006). Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS Pathog* **2**, 0087–0100.
- Le Negrate, G., Faustin, B., Welsh, K., Loeffler, M., Krajewska, M., Hasegawa, P., Mukherjee, S., Orth, K., Krajewski, S., Godzik, A., et al.** (2008). *Salmonella* Secreted Factor L Deubiquitinase of *Salmonella typhimurium* Inhibits NF- $\kappa$ B, Suppresses I $\kappa$ B $\alpha$  Ubiquitination and Modulates Innate Immune Responses. *J Immunol* **180**, 5045–5056.
- Lee, P. C. and Rietsch, A.** (2015). Fueling type III secretion. *Trends Microbiol* **23**, 296–300.
- Lee, A. K., Detweiler, C. S. and Falkow, S.** (2000). OmpR regulates the two-component system SsrA-SsrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J Bacteriol* **182**, 771–781.
- Lee, S., Chang, J., Renvoisé, B., Tipirneni, A., Yang, S. and Blackstone, C.** (2012a). MITD1 is recruited to midbodies by ESCRT-III and participates in cytokinesis. *Mol Biol Cell* **23**, 4347–4361.
- Lee, S., Chang, J., Renvoisé, B., Tipirneni, A., Yang, S. and Blackstone, C.** (2012b). MITD1 is recruited to midbodies by ESCRT-III and participates in cytokinesis. *Mol Biol Cell* **23**, 4347–4361.
- Lehmeier, T., Raker, V., Hermann, H. and Lührmann, R.** (1994). cDNA cloning of the Sm proteins D2 and D3 from human small nuclear ribonucleoproteins: Evidence for a direct D1-D2 interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12317–12321.
- Lerner, M. R. and Argetsinger Steitz, J.** (1979). Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 5495–5499.
- Lesnick, M. L., Reiner, N. E., Fierer, J. and Guiney, D. G.** (2001). The *Salmonella spvB* virulence gene encodes an enzyme that ADP-ribosylates actin and destabilizes the cytoskeleton of eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **39**, 1464–1470.
- Leung, A. K. W., Nagai, K. and Li, J.** (2011). Structure of the spliceosomal U4 snRNP core domain and its implication for snRNP biogenesis. *Nature* **473**, 536–539.
- Leyton, D. L., Rossiter, A. E. and Henderson, I. R.** (2012). From self sufficiency to dependence: Mechanisms and factors important for autotransporter biogenesis. *Nat Rev Microbiol* **10**, 213–225.
- Li, J. Y., English, M. A., Ball, H. J., Yeyati, P. L., Waxman, S. and Licht, J. D.** (1997). Sequence-specific DNA binding and transcriptional regulation by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J Biol Chem* **272**, 22447–55.
- Li, S., Zhang, L., Yao, Q., Li, L., Dong, N., Rong, J., Gao, W., Ding, X., Sun, L., Chen, X., et al.** (2013). Pathogen blocks host death receptor signalling by arginine GlcNAcylation of death

domains. *Nature* **501**, 242–6.

- Li, Y. yuan, Wang, T., Gao, S., Xu, G. mei, Niu, H., Huang, R. and Wu, S. yan** (2016). *Salmonella* plasmid virulence gene *spvB* enhances bacterial virulence by inhibiting autophagy in a zebrafish infection model. *Fish Shellfish Immunol* **49**, 252–259.
- Liao, A. P., Petrof, E. O., Kuppireddi, S., Zhao, Y., Xia, Y., Claud, E. C. and Sun, J.** (2008). *Salmonella* type III effector AvrA stabilizes cell tight junctions to inhibit inflammation in intestinal epithelial cells. *PLoS One* **3**,.
- Libby, S. J., Lesnick, M., Hasegawa, P., Weidenhammer, E. and Guiney, D. G.** (2000). The *Salmonella* virulence plasmid *spv* genes are required for cytopathology in human. *Cell Microbiol* **2**, 49–58.
- Liebl, D., Qi, X., Zhe, Y., Barnett, T. C. and Teasdale, R. D.** (2017). SopB-Mediated Recruitment of SNX18 Facilitates *Salmonella* Typhimurium Internalization by the Host Cell. *Front Cell Infect Microbiol* **7**,.
- Lim, S., Kim, B., Choi, H. S., Lee, Y. and Ryu, S.** (2006). Fis is required for proper regulation of *ssaG* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microb Pathog* **41**, 33–42.
- Lim, S., Yun, J., Yoon, H., Park, C., Kim, B., Jeon, B., Kim, D. and Ryu, S.** (2007). Mlc regulation of *Salmonella* pathogenicity island I gene expression via *hilE* repression. *Nucleic Acids Res* **35**, 1822–1832.
- Liu, J. M., Zhang, M. J., Zhao, L., Cui, B., Li, Z. Bin, Zhao, H. Y., Sun, L. H., Tao, B., Li, M. and Ning, G.** (2010). Analysis of recently identified osteoporosis susceptibility genes in Han Chinese women. *J Clin Endocrinol Metab* **95**,.
- Liu, J., Guo, J. T., Li, Y. G., Johnston, R. N., Liu, G. R. and Liu, S. L.** (2013). The type VI secretion system gene cluster of *Salmonella typhimurium*: Required for full virulence in mice. *J Basic Microbiol* **53**, 600–607.
- Llosa, M., Roy, C. and Dehio, C.** (2009). Bacterial type IV secretion systems in human disease. In *Molecular Microbiology*, pp. 141–151. Mol Microbiol.
- Lockman, H. A. and Curtiss, R.** (1992). Isolation and characterization of conditional adherent and non-type 1 fimbriated *Salmonella typhimurium* mutants. *Mol Microbiol* **6**, 933–945.
- Long, J. Z. and Cravatt, B. F.** (2011). The metabolic serine hydrolases and their functions in mammalian physiology and disease. *Chem Rev* **111**, 6022–6063.
- Lopez-Fanarraga, M., Avila, J., Guasch, A., Coll, M. and Zabala, J. C.** (2001). Review: Postchaperonin tubulin folding cofactors and their role in microtubule dynamics. *J Struct Biol* **135**, 219–229.
- López-Garrido, J. and Casadesús, J.** (2010). Regulation of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 by DNA adenine methylation. *Genetics* **184**, 637–649.
- López-Garrido, J. and Casadesús, J.** (2012). Crosstalk between virulence loci: Regulation of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 (SPI-1) by products of the *std* fimbrial operon. *PLoS One* **7**,.
- Loquet, A., Sgourakis, N. G., Gupta, R., Giller, K., Riedel, D., Goosmann, C., Griesinger, C., Kolbe, M., Baker, D., Becker, S., et al.** (2012). Atomic model of the type III secretion

system needle. *Nature* **486**, 276–279.

- Lucas, R. L., Lostroh, C. P., DiRusso, C. C., Spector, M. P., Wanner, B. L. and Lee, C. A.** (2000). Multiple factors independently regulate *hilA* and invasion gene expression in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol* **182**, 1872–1882.
- Lucchini, S., Rowley, G., Goldberg, M. D., Hurd, D., Harrison, M. and Hinton, J. C. D.** (2006). HNS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria. *PLoS Pathog* **2**, 0746–0752.
- Lunelli, M., Hurwitz, R., Lambers, J. and Kolbe, M.** (2011). Crystal structure of prgi-sipd: Insight into a secretion competent state of the type three secretion system needle tip and its interaction with host ligands. *PLoS Pathog* **7**,.
- Lyman, S. K., Gerace, L. and Baserga, S. J.** (1999). Human Nop5/Nop58 is a component common to the box C/D small nucleolar ribonucleoproteins. *RNA* **5**, 1597–1604.
- Lytle, B. L., Peterson, F. C., Qiu, S.-H., Luo, M., Zhao, Q., Markley, J. L. and Volkman, B. F.** (2004). Solution structure of a ubiquitin-like domain from tubulin-binding cofactor B. *J Biol Chem* **279**, 46787–93.
- Macnab, R. M.** (2003). How Bacteria Assemble Flagella. *Annu Rev Microbiol* **57**, 77–100.
- Malik-Kale, P., Jolly, C. E., Lathrop, S., Winfree, S., Luterbach, C. and Steele-Mortimer, O.** (2011). *Salmonella*- at home in the host cell. *Front Microbiol* **2**,.
- Malik-Kale, P., Winfree, S. and Steele-Mortimer, O.** (2012). The bimodal lifestyle of intracellular *Salmonella* in epithelial cells: Replication in the cytosol obscures defects in vacuolar replication. *PLoS One* **7**,.
- Mallo, G. V., Espina, M., Smith, A. C., Terebiznik, M. R., Alemán, A., Finlay, B. B., Rameh, L. E., Grinstein, S. and Brummell, J. H.** (2008). SopB promotes phosphatidylinositol 3-phosphate formation on *Salmonella* vacuoles by recruiting Rab5 and Vps34. *J Cell Biol* **182**, 741–752.
- Maloy, S. R.** (1990). *Experimental techniques in bacterial genetics*. Boston: Jones & Barlett.
- Mangan, M. W., Lucchini, S., Danino, V., Cróinín, T. Ó., Hinton, J. C. D. and Dorman, C. J.** (2006). The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **59**, 1831–1847.
- Marcus, S. L., Wenk, M. R., Steele-Mortimer, O. and Finlay, B. B.** (2001). A synaptojanin-homologous region of *Salmonella* typhimurium SigD is essential for inositol phosphatase activity and Akt activation. *FEBS Lett* **494**, 201–207.
- Marlovits, T. C., Kubori, T., Lara-Tejero, M., Thomas, D., Unger, V. M. and Galán, J. E.** (2006). Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome. *Nature* **441**, 637–640.
- Martínez, L. C., Yakhnin, H., Camacho, M. I., Georgellis, D., Babitzke, P., Puente, J. L. and Bustamante, V. H.** (2011). Integration of a complex regulatory cascade involving the SirA/BarA and Csr global regulatory systems that controls expression of the *Salmonella* SPI-1 and SPI-2 virulence regulons through HilD. *Mol Microbiol* **80**, 1637–1656.
- Martínez, L. C., Banda, M. M., Fernández-Mora, M., Santana, F. J. and Bustamante, V. H.** (2014). HilD induces expression of *Salmonella* pathogenicity Island 2 genes by displacing

- the global negative regulator H-NS from *ssrAB*. *J Bacteriol* **196**, 3746–3755.
- Martinalet, D., Zhu, P. and Lieberman, J.** (2005). Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* **22**, 355–370.
- Mathew, R., Seiler, M. P., Scanlon, S. T., Mao, A. P., Constantinides, M. G., Bertozzi-Villa, C., Singer, J. D. and Bendelac, A.** (2012). BTB-ZF factors recruit the E3 ligase cullin 3 to regulate lymphoid effector programs. *Nature* **491**, 618–621.
- Matsushima, N., Takatsuka, S., Miyashita, H. and Kretsinger, R. H.** (2018). Leucine Rich Repeat Proteins: Sequences, Mutations, Structures and Diseases. *Protein Pept Lett* **26**, 108–131.
- Mazar, J. and Cotter, P. A.** (2007). New insight into the molecular mechanisms of two-partner secretion. *Trends Microbiol* **15**, 508–515.
- McClelland, M., Sanderson, K. E., Spieth, J., Clifton, S. W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., et al.** (2001). Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**, 852–856.
- McCormick, B. A., Colgan, S. P., Delp-Archer, C., Miller, S. I. and Madara, J. L.** (1993). *Salmonella typhimurium* attachment to human intestinal epithelial monolayers: Transcellular signalling to subepithelial neutrophils. *J Cell Biol* **123**, 895–907.
- McGhie, E. J., Hayward, R. D. and Koronakis, V.** (2001). Cooperation between actin-binding proteins of invasive *Salmonella*: SipA potentiates SipC nucleation and bundling of actin. *EMBO J* **20**, 2131–2139.
- McGhie, E. J., Hayward, R. D. and Koronakis, V.** (2004). Control of actin turnover by a *Salmonella* invasion protein. *Mol Cell* **13**, 497–510.
- Mclaughlin, L. M., Xu, H., Carden, S. E., Fisher, S., Reyes, M., Heilshorn, S. C. and Monack, D. M.** (2014). A microfluidic-based genetic screen to identify microbial virulence factors that inhibit dendritic cell migration †. *438 | Integr Biol* **6**, 438.
- McQuiston, J. R., Parrenas, R., Ortiz-Rivera, M., Gheesling, L., Brenner, F. and Fields, P. I.** (2004). Sequencing and Comparative Analysis of Flagellin Genes *fliC*, *fljB*, and *flpA* from *Salmonella*. *J Clin Microbiol* **42**, 1923–1932.
- Méresse, S., Unsworth, K. E., Habermann, A., Griffiths, G., Fang, F., Martínez-Lorenzo, M. J., Waterman, S. R., Gorvel, J. P. and Holden, D. W.** (2001). Remodelling of the actin cytoskeleton is essential for replication of intravacuolar *Salmonella*. *Cell Microbiol* **3**, 567–577.
- Miao, E. A. and Miller, S. I.** (2000). A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7539–44.
- Miao, E. A., Scherer, C. A., Tsolis, R. M., Kingsley, R. A., Adams, L. G., Bäumlér, A. J. and Miller, S. I.** (1999). *Salmonella typhimurium* leucine-rich repeat proteins are targeted to the SPI1 and SPI2 type III secretion systems. *Mol Microbiol* **34**, 850–64.
- Miao, E. A., Freeman, J. A. and Miller, S. I.** (2002). Transcription of the SsrAB regulon is repressed by alkaline pH and is independent of PhoPQ and magnesium concentration. *J Bacteriol* **184**, 1493–1497.

- Miao, E. A., Brittnacher, M., Haraga, A., Jeng, R. L., Welch, M. D. and Miller, S. I.** (2003). *Salmonella* effectors translocated across the vacuolar membrane interact with the actin cytoskeleton. *Mol Microbiol* **48**, 401–415.
- Miao, E. A., Alpuche-Aranda, C. M., Dors, M., Clark, A. E., Bader, M. W., Miller, S. I. and Aderem, A.** (2006). Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1 $\beta$  via Ipaf. *Nat Immunol* **7**, 569–575.
- Miller, S. I., Kukral, A. M. and Mekalanos, J. J.** (1989). A two-component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella* typhimurium virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5054–5058.
- Misselwitz, B., Kreibich, S. K., Rout, S., Stecher, B., Periaswamy, B. and Hardt, W. D.** (2011). *Salmonella enterica* serovar typhimurium binds to hela cells via fim-mediated reversible adhesion and irreversible type three secretion system 1-mediated docking. *Infect Immun* **79**, 330–341.
- Moest, T. P. and Méresse, S.** (2013). *Salmonella* T3SSs: Successful mission of the secret(ion) agents. *Curr Opin Microbiol* **16**, 38–44.
- Monack, D. M., Navarre, W. W. and Falkow, S.** (2001). *Salmonella*-induced macrophage death: The role of caspase-1 in death and inflammation. *Microbes Infect* **3**, 1201–1212.
- Monack, D. M., Bouley, D. M. and Falkow, S.** (2004). *Salmonella* typhimurium Persists within Macrophages in the Mesenteric Lymph Nodes of Chronically Infected Nramp1+/+ Mice and Can Be Reactivated by IFN $\gamma$  Neutralization. *J Exp Med* **199**, 231–241.
- Morgan, E., Bowen, A. J., Carnell, S. C., Wallis, T. S. and Stevens, M. P.** (2007). SiiE is secreted by the *Salmonella enterica* serovar typhimurium pathogenicity island 4-encoded secretion system and contributes to intestinal colonization in cattle. *Infect Immun* **75**, 1524–1533.
- Morgenstern, J. P. and Land, H.** (1990). Advanced mammalian gene transfer: High titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res* **18**, 3587–3596.
- Morita, E., Sandrin, V., Chung, H.-Y., Morham, S. G., Gygi, S. P., Rodesch, C. K. and Sundquist, W. I.** (2007). Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO J* **26**, 4215–27.
- Morpeth, S. C., Ramadhani, H. O. and Crump, J. A.** (2009). Invasive non-typhi salmonella disease in africa. *Clin Infect Dis* **49**, 606–611.
- Mota, L. J., Ramsden, A. E., Liu, M., Castle, J. D. and Holden, D. W.** (2009). SCAMP3 is a component of the *Salmonella*-induced tubular network and reveals an interaction between bacterial effectors and post-Golgi trafficking. *Cell Microbiol* **11**, 1236–1253.
- Müller, A. J., Hoffmann, C., Galle, M., Van Den Broeke, A., Heikenwalder, M., Falter, L., Misselwitz, B., Kremer, M., Beyaert, R. and Hardt, W. D.** (2009). The *S. Typhimurium* Effector SopE Induces Caspase-1 Activation in Stromal Cells to Initiate Gut Inflammation. *Cell Host Microbe* **6**, 125–136.
- Müller, A. J., Kaiser, P., Dittmar, K. E. J., Weber, T. C., Haueter, S., Endt, K., Songhet, P., Zellweger, C., Kremer, M., Fehling, H. J., et al.** (2012). *Salmonella* gut invasion involves TTSS-2-dependent epithelial traversal, basolateral exit, and uptake by epithelium-



sampling lamina propria phagocytes. *Cell Host Microbe* **11**, 19–32.

**Mund, M., Neu, A., Ullmann, J., Neu, U. and Sprangers, R.** (2011). Structure of the LSm657 complex: An assembly intermediate of the LSm1-7 and LSm2-8 rings. *J Mol Biol* **414**, 165–176.

**Myeni, S. K. and Zhou, D.** (2010). The C terminus of SipC binds and bundles F-actin to promote *Salmonella* invasion. *J Biol Chem* **285**, 13357–13363.

**Myeni, S. K., Wang, L. and Zhou, D.** (2013). SipB-SipC Complex Is Essential for Translocon Formation. *PLoS One* **8**,.

**Nagai, T., Mukoyama, S., Kagiwada, H., Goshima, N. and Mizuno, K.** (2018). Cullin-3–KCTD10-mediated CEP97 degradation promotes primary cilium formation. *J Cell Sci* **131**,.

**Navarre, W. W., Halsey, T. A., Walthers, D., Frye, J., McClelland, M., Potter, J. L., Kenney, L. J., Gunn, J. S., Fang, F. C. and Libby, S. J.** (2005). Co-regulation of *Salmonella enterica* genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ. *Mol Microbiol* **56**, 492–508.

**Nawabi, P., Catron, D. M. and Haldar, K.** (2008). Esterification of cholesterol by a type III secretion effector during intracellular *Salmonella* infection. *Mol Microbiol* **68**, 173–185.

**Newson, J. P. M., Scott, N. E., Yeuk Wah Chung, I., Wong Fok Lung, T., Giogha, C., Gan, J., Wang, N., Strugnell, R. A., Brown, N. F., Cygler, M., et al.** (2019). *Salmonella* Effectors SseK1 and SseK3 Target Death Domain Proteins in the TNF and TRAIL Signaling Pathways. *Mol Cell Proteomics* **18**, 1138–1156.

**Nguyen, V. S., Douzi, B., Durand, E., Roussel, A., Cascales, E. and Cambillau, C.** (2018). Towards a complete structural deciphering of Type VI secretion system. *Curr Opin Struct Biol* **49**, 77–84.

**Nichols, C. D. and Casanova, J. E.** (2010). *Salmonella*-directed recruitment of new membrane to invasion foci via the host exocyst complex. *Curr Biol* **20**, 1316–1320.

**Nieto, P. A., Pardo-Roa, C., Salazar-Echegarai, F. J., Tobar, H. E., Coronado-Arrázola, I., Riedel, C. A., Kalergis, A. M. and Bueno, S. M.** (2016). New insights about excisable pathogenicity islands in *Salmonella* and their contribution to virulence. *Microbes Infect* **18**, 302–309.

**Nikolaus, T., Deiwick, J., Rappl, C., Freeman, J. A., Schröder, W., Miller, S. I. and Hensel, M.** (2001). SseBCD proteins are secreted by the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 and function as a translocon. *J Bacteriol* **183**, 6036–6045.

**Nishimura, H., Emoto, M., Kimura, K. and Yoshikai, Y.** (1997). Hsp70 protects macrophages infected with *Salmonella choleraesuis* against TNF- $\alpha$ -induced cell death. *Cell Stress Chaperones* **2**, 50–59.

**Norkowski, S., Schmidt, M. A. and Rüter, C.** (2018). The species-spanning family of LPX-motif harbouring effector proteins. *Cell Microbiol* **20**,.

**Ochman, H. and Wilson, A. C.** (1987). Evolution in bacteria: Evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *J Mol Evol* **26**, 74–86.

**Ohlson, M. B., Huang, Z., Alto, N. M., Blanc, M. P., Dixon, J. E., Chai, J. and Miller, S. I.** (2008).

Structure and Function of *Salmonella* SifA Indicate that Its Interactions with SKIP, SseJ, and RhoA Family GTPases Induce Endosomal Tubulation. *Cell Host Microbe* **4**, 434–446.

- Olekhovich, I. N. and Kadner, R. J.** (2002). DNA-binding activities of the HilC and HilD virulence regulatory proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **184**, 4148–4160.
- Omori, K. and Idei, A.** (2003). Gram-negative bacterial atp-binding cassette protein exporter family and diverse secretory proteins. *J Biosci Bioeng* **95**, 1–12.
- Orchard, R. C. and Alto, N. M.** (2012). Mimicking GEFs: A common theme for bacterial pathogens. *Cell Microbiol* **14**, 10–18.
- Osborne, S. E. and Coombes, B. K.** (2011). Transcriptional priming of *Salmonella* Pathogenicity island-2 Precedes Cellular Invasion. *PLoS One* **6**,
- Oshima, T., Ishikawa, S., Kurokawa, K., Aiba, H. and Ogasawara, N.** (2006). *Escherichia coli* histone-like protein H-NS preferentially binds to horizontally acquired DNA in association with RNA polymerase. *DNA Res* **13**, 141–153.
- Padmanabhan, B., Kuzuhara, T., Adachi, N. and Horikoshi, M.** (2003). The Crystal Structure of CCG1/TAF II 250-interacting Factor B (CIB)\*.
- Paesold, G., Guiney, D. G., Eckmann, L. and Kagnoff, M. F.** (2002). Genes in the *Salmonella* pathogenicity island 2 and the *Salmonella* virulence plasmid are essential for *Salmonella*-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol* **4**, 771–781.
- Palmer, T., Finney, A. J., Saha, C. K., Atkinson, G. C. and Sargent, F.** (2021). A holin/peptidoglycan hydrolase-dependent protein secretion system. *Mol Microbiol* **115**, 345–355.
- Pan, W., de Graca, L. S., Shao, Y., Yin, Q., Wu, H. and Jiang, X.** (2009). PHAPI/pp32 suppresses tumorigenesis by stimulating Apoptosis. *J Biol Chem* **284**, 6946–6954.
- Park, J. B., Kim, Y. H., Yoo, Y., Kim, J., Jun, S.-H., Cho, J. W., El Qaidi, S., Walpole, S., Monaco, S., García-García, A. A., et al.** (2018). Structural basis for arginine glycosylation of host substrates by bacterial effector proteins. *Nat Commun* **9**, 4283.
- Parkhill, J., Dougan, G., James, K. D., Thomson, N. R., Pickard, D., Wain, J., Churcher, C., Mungall, K. L., Bentley, S. D., Holden, M. T. G., et al.** (2001). Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* **413**, 848–852.
- Parry, C. M., Hien, T. T., Dougan, G., White, N. J. and Farrar, J. J.** (2002). Typhoid Fever. *N Engl J Med* **347**, 1770–1782.
- Parsons, D. A. and Heffron, F.** (2005). sciS, an icmF homolog in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, limits intracellular replication and decreases virulence. *Infect Immun* **73**, 4338–4345.
- Patel, J. C. and Galán, J. E.** (2006). Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. *J Cell Biol* **175**, 453–463.
- Pavlova, B., Volf, J., Ondrackova, P., Matiasovic, J., Stepanova, H., Crhanova, M., Karasova, D., Faldyna, M. and Rychlik, I.** (2011). SPI-1-encoded type III secretion system of

*Salmonella enterica* is required for the suppression of porcine alveolar macrophage cytokine expression. *Vet Res* **42**,.

- Pearson, J. S., Giogha, C., Ong, S. Y., Kennedy, C. L., Kelly, M., Robinson, K. S., Lung, T. W. F., Mansell, A., Riedmaier, P., Oates, C. V. L., et al.** (2013). A type III effector antagonizes death receptor signalling during bacterial gut infection. *Nature* **501**, 247–51.
- Pérez-Morales, D., Banda, M. M., Chau, N. Y. E., Salgado, H., Martínez-Flores, I., Ibarra, J. A., Ilyas, B., Coombes, B. K. and Bustamante, V. H.** (2017). The transcriptional regulator SsrB is involved in a molecular switch controlling virulence lifestyles of *Salmonella*. *PLoS Pathog* **13**,.
- Pesavento, C., Becker, G., Sommerfeldt, N., Possling, A., Tschowri, N., Mehlis, A. and Hengge, R.** (2008). Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **22**, 2434–2446.
- Peters, B., Stein, J., Klingl, S., Sander, N., Sandmann, A., Taccardi, N., Sticht, H., Gerlach, R. G., Muller, Y. A. and Hensel, M.** (2017). Structural and functional dissection reveals distinct roles of Ca<sup>2+</sup>-binding sites in the giant adhesin SiiE of *Salmonella enterica*. *PLoS Pathog* **13**,.
- Pezoa, D., Yang, H. J., Blondel, C. J., Santiviago, C. A., Andrews-Polymeris, H. L. and Contreras, I.** (2013). The Type VI Secretion System Encoded in SPI-6 Plays a Role in Gastrointestinal Colonization and Systemic Spread of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the Chicken. *PLoS One* **8**,.
- Piscatelli, H. L., Li, M. and Zhou, D.** (2016). Dual 4- and 5-phosphatase activities regulate SopB-dependent phosphoinositide dynamics to promote bacterial entry. *Cell Microbiol* **18**, 705–719.
- Popoff, M. Y., Bockemühl, J. and Gheesling, L. L.** (2004). Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* **155**, 568–570.
- Porwollik, S. and McClelland, M.** (2003). Lateral gene transfer in *Salmonella*. *Microbes Infect* **5**, 977–989.
- Porwollik, S., Boyd, E. F., Choy, C., Cheng, P., Florea, L., Proctor, E. and McClelland, M.** (2004). Characterization of *Salmonella enterica* subspecies I genovars by use of microarrays. *J Bacteriol* **186**, 5883–5898.
- Powis, G. and Montfort, W. R.** (2001). Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **30**, 421–455.
- Pukatzki, S., Ma, A. T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W. C., Heidelberg, J. F. and Mekalanos, J. J.** (2006). Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1528–33.
- Pukatzki, S., McAuley, S. B. and Miyata, S. T.** (2009). The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Curr Opin Microbiol* **12**, 11–17.
- Puszyk, W., Down, T., Grimwade, D., Chomienne, C., Oakey, R. J., Solomon, E. and Guidez, F.** (2013). The epigenetic regulator PLZF represses L1 retrotransposition in germ and progenitor cells. *EMBO J* **32**, 1941–1952.

- Quarmby, L. M. and Parker, J. D. K.** (2005). Cilia and the cell cycle? *J Cell Biol* **169**, 707–710.
- Que, F., Wu, S. and Huang, R.** (2013). *Salmonella* pathogenicity Island 1 (SPI-1) at work. *Curr Microbiol* **66**, 582–587.
- Queiroz, M. H., Madrid, C., Paytubi, S., Balsalobre, C. and Juárez, A.** (2011). Integration host factor alleviates H-NS silencing of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium master regulator of SPI1, *hilA*. *Microbiology* **157**, 2504–2514.
- Raghunathan, D., Wells, T. J., Morris, F. C., Shaw, R. K., Bobat, S., Peters, S. E., Paterson, G. K., Jensen, K. T., Leyton, D. L., Blair, J. M. A., et al.** (2011). SadA, a trimeric autotransporter from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, can promote biofilm formation and provides limited protection against infection. *Infect Immun* **79**, 4342–4352.
- Raijmakers, R., Noordman, Y. E., Van Venrooij, W. J. and Pruijn, G. J. M.** (2002). Protein-protein interactions of hCsl4p with other human exosome subunits. *J Mol Biol* **315**, 809–818.
- Raines, S. A., Hodgkinson, M. R., Dowle, A. A. and Pryor, P. R.** (2017). The *Salmonella* effector SseJ disrupts microtubule dynamics when ectopically expressed in normal rat kidney cells. *PLoS One* **12**,.
- Rajashekar, R. and Hensel, M.** (2011). Dynamic modification of microtubule-dependent transport by effector proteins of intracellular *Salmonella enterica*. *Eur J Cell Biol* **90**, 897–902.
- Rajashekar, R., Liebl, D., Seitz, A. and Hensel, M.** (2008). Dynamic remodeling of the endosomal system during formation of *Salmonella*-induced filaments by intracellular *Salmonella enterica*. *Traffic* **9**, 2100–2116.
- Rajendran, A., Vaidya, K., Mendoza, J., Bridwell-Rabb, J. and Kamat, S. S.** (2020). Functional Annotation of ABHD14B, an Orphan Serine Hydrolase Enzyme. *Biochemistry* **59**, 183–196.
- Ramos-Morales, F.** (2012). Impact of *Salmonella enterica* Type III Secretion System Effectors on the Eukaryotic Host Cell. *ISRN Cell Biol* **2012**, 1–36.
- Ramsden, A. E., Holden, D. W. and Mota, L. J.** (2007). Membrane dynamics and spatial distribution of *Salmonella*-containing vacuoles. *Trends Microbiol* **15**, 516–524.
- Rao, S., Schieber, A. M. P., O’Connor, C. P., Leblanc, M., Michel, D. and Ayres, J. S.** (2017). Pathogen-Mediated Inhibition of Anorexia Promotes Host Survival and Transmission. *Cell* **168**, 503-516.e12.
- Rathinavelan, T., Lara-Tejero, M., Lefebvre, M., Chatterjee, S., McShan, A. C., Guo, D. C., Tang, C., Galan, J. E. and De Guzman, R. N.** (2014). NMR model of PrgI-SipD interaction and its implications in the needle-tip assembly of the *Salmonella* type III secretion system. *J Mol Biol* **426**, 2958–2969.
- Rêgo, A. T., Chandran, V. and Waksman, G.** (2010). Two-step and one-step secretion mechanisms in Gram-negative bacteria: Contrasting the type IV secretion system and the chaperone-usheer pathway of pilus biogenesis. *Biochem J* **425**, 475–488.
- Reilly, P. T., Yu, Y., Hamiche, A. and Wang, L.** (2014). Cracking the ANP32 whips: Important functions, unequal requirement, and hints at disease implications. *BioEssays* **36**, 1062–1071.

- Renouf, S., Beullens, M., Wera, S., Van Eynde, A., Sikela, J., Stalmans, W. and Bollen, M.** (1995). Molecular cloning of a human polypeptide related to yeast sds22, a regulator of protein phosphatase-1. *FEBS Lett* **375**, 75–78.
- Rice, C. J., Ramachandran, V. K., Shearer, N. and Thompson, A.** (2015). Transcriptional and post-transcriptional modulation of SPI1 and SPI2 expression by ppGpp, RpoS and DksA in *Salmonella enterica* sv Typhimurium. *PLoS One* **10**,.
- Roberts, S. A., Strande, N., Burkhalter, M. D., Strom, C., Havener, J. M., Hasty, P. and Ramsden, D. A.** (2010). Ku is a 5'-dRP/AP lyase that excises nucleotide damage near broken ends. *Nature* **464**, 1214–1217.
- Robinson, N., McComb, S., Mulligan, R., Dudani, R., Krishnan, L. and Sad, S.** (2012). Type I interferon induces necroptosis in macrophages during infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Nat Immunol* **13**, 954–62.
- Rolhion, N., Furniss, R. C. D., Grabe, G., Ryan, A., Liu, M., Matthews, S. A. and Holden, D. W.** (2016). Inhibition of Nuclear Transport of NF- $\kappa$ B p65 by the *Salmonella* Type III Secretion System Effector SpvD. *PLoS Pathog* **12**,.
- Ruan, H. H., Li, Y., Zhang, X. X., Liu, Q., Ren, H., Zhang, K. S. and Zhao, H.** (2014). Identification of TRAF6 as a ubiquitin ligase engaged in the ubiquitination of SopB, a virulence effector protein secreted by *Salmonella typhimurium*. *Biochem Biophys Res Commun* **447**, 172–177.
- Ruiz-Albert, J., Mundy, R., Yu, X. J., Beuzón, C. R. and Holden, D. W.** (2003). SseA is a chaperone for the SseB and SseD translocon components of the *Salmonella* pathogenicity-island-2-encoded type III secretion system. *Microbiology* **149**, 1103–1111.
- Rytkönen, A., Poh, J., Garmendia, J., Boyle, C., Thompson, A., Liu, M., Freemont, P., Hinton, J. C. D. and Holden, D. W.** (2007). SseL, a *Salmonella* deubiquitinase required for macrophage killing and virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3502–3507.
- S, E. Q., NE, S. and PR, H.** (2021). Arginine glycosylation enhances methylglyoxal detoxification. *Sci Rep* **11**,.
- Sabbagh, S. C., Forest, C. G., Lepage, C., Leclerc, J. M. and Daigle, F.** (2010). So similar, yet so different: Uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. *FEMS Microbiol Lett* **305**, 1–13.
- Saier, M. H.** (2006). Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. *J Membr Biol* **214**, 75–90.
- Salcedo, S. P. and Holden, D. W.** (2003). SseG, a virulence protein that targets *Salmonella* to the Golgi network. *EMBO J* **22**, 5003–5014.
- Sana, T. G., Flaugnatti, N., Lugo, K. A., Lam, L. H., Jacobson, A., Baylot, V., Durand, E., Journet, L., Cascales, E. and Monack, D. M.** (2016). *Salmonella Typhimurium* utilizes a T6SS-mediated antibacterial weapon to establish in the host gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E5044–E5051.
- Sanderson, K. E., Hessel, A. and Rudd, K. E.** (1995). Genetic map of *Salmonella typhimurium*, edition VIII. *Microbiol Rev* **59**, 241–303.
- Santos, R. L., Zhang, S., Tsolis, R. M., Kingsley, R. A., Garry Adams, L. and Bäumlner, A. J.**

- (2001). Animal models of Salmonella infections: Enteritis versus typhoid fever. *Microbes Infect* **3**, 1335–1344.
- Schaefer, M. K. E., Schmalbruch, H., Buhler, E., Lopez, C., Martin, N., Guénet, J. L. and Haase, G.** (2007). Progressive motor neuronopathy: A critical role of the tubulin chaperone TBCE in axonal tubulin routing from the Golgi apparatus. *J Neurosci* **27**, 8779–8789.
- Scharow, A., Knappe, D., Reindl, W., Hoffmann, R. and Berg, T.** (2016). Development of Bifunctional Inhibitors of Polo-Like Kinase 1 with Low-Nanomolar Activities Against the Polo-Box Domain. *ChemBioChem* **17**, 759–767.
- Schechter, L. M. and Lee, C. A.** (2001). AraC/XylS family members, HilC and HilD, directly bind and derepress the *Salmonella typhimurium* *hilA* promoter. *Mol Microbiol* **40**, 1289–1299.
- Schlumberger, M. C. and Hardt, W. D.** (2006). *Salmonella* type III secretion effectors: Pulling the host cell's strings. *Curr Opin Microbiol* **9**, 46–54.
- Schlumberger, M. C., Friebel, A., Buchwald, G., Scheffzek, K., Wittinghofer, A. and Hardt, W. D.** (2003). Amino acids of the bacterial toxin SopE involved in G nucleotide exchange on Cdc42. *J Biol Chem* **278**, 27149–27159.
- Schmidt, T. I., Kleylein-Sohn, J., Westendorf, J., Le Clech, M., Lavoie, S. B., Stierhof, Y. D. and Nigg, E. A.** (2009). Control of Centriole Length by CPAP and CP110. *Curr Biol* **19**, 1005–1011.
- Schmitt, C. K., Ikeda, J. S., Darnell, S. C., Watson, P. R., Bispham, J., Wallis, T. S., Weinstein, D. L., Metcalf, E. S. and O'Brien, A. D.** (2001). Absence of all components of the flagellar export and synthesis machinery differentially alters virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium in models of typhoid fever, survival in macrophages, tissue culture invasiveness, and calf enteroco. *Infect Immun* **69**, 5619–5625.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. and Eliceiri, K. W.** (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**, 671–675.
- Schraidt, O. and Marlovits, T. C.** (2011). Three-dimensional model of *Salmonella*'s needle complex at subnanometer resolution. *Science (80- )* **331**, 1192–1195.
- Schraidt, O., Lefebvre, M. D., Brunner, M. J., Schmied, W. H., Schmidt, A., Radics, J., Mechtler, K., Galán, J. E. and Marlovits, T. C.** (2010). Topology and organization of the *Salmonella typhimurium* type III secretion needle complex components. *PLoS Pathog* **6**, 1–12.
- Schroeder, N., Henry, T., de Chastellier, C., Zhao, W., Aude-Agnés, G., Gorvel, J. P. and Méresse, S.** (2010). The virulence protein SopD2 regulates membrane dynamics of *Salmonella*-containing vacuoles. *PLoS Pathog* **6**, 1–15.
- Schroeder, N., Mota, L. J. and Méresse, S.** (2011). *Salmonella*-induced tubular networks. *Trends Microbiol* **19**, 268–277.
- Selig, L., Benichou, S., Rogel, M. E., Wu, L. I., Vodicka, M. A., Sire, J., Benarous, R. and Emerman, M.** (1997). Uracil DNA glycosylase specifically interacts with Vpr of both human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus of sooty mangabeys, but binding does not correlate with cell cycle arrest. *J Virol* **71**, 4842–4846.
- Seo, S. beom, McNamara, P., Heo, S., Turner, A., Lane, W. S. and Chakravarti, D.** (2001). Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex

containing the set oncoprotein. *Cell* **104**, 119–130.

**Serna, M., Carranza, G., Martín-Benito, J., Janowski, R., Canals, A., Coll, M., Zabala, J. C. and Valpuesta, J. M.** (2015). The structure of the complex between  $\alpha$ -tubulin, TBCE and TBCB reveals a tubulin dimer dissociation mechanism. *J Cell Sci* **128**, 1824–34.

**Seth-Smith, H. M. B.** (2008). SPI-7: *Salmonella*'s Vi-encoding Pathogenicity Island. *J Infect Dev Ctries* **2**, 267–271.

**Sherman, F., Fink, G. R. and Hicks, J. B.** (1987). *Laboratory course manual for Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory.

**Shimanovskaya, E., Viscardi, V., Lesigang, J., Lettman, M. M., Qiao, R., Svergun, D. I., Round, A., Oegema, K. and Dong, G.** (2014). Structure of the *C. Elegans* ZYG-1 cryptic polo box suggests a conserved mechanism for centriolar docking of Plk4 kinases. *Structure* **22**, 1090–1104.

**Silphaduang, U., Mascarenhas, M., Karmali, M. and Coombes, B. K.** (2007). Repression of intracellular virulence factors in *Salmonella* by the Hha and YdgT nucleoid-associated proteins. *J Bacteriol* **189**, 3669–3673.

**Simone, C.** (2007). Signal-dependent control of autophagy and cell death in colorectal cancer cell: The role of the p38 pathway. *Autophagy* **3**, 468–471.

**Smith, A. C., Won, D. H., Braun, V., Jiang, X., Macrae, C., Casanova, J. E., Scidmore, M. A., Grinstein, S., Meyer, T. and Brummel, J. H.** (2007). A network of Rab GTPases controls phagosome maturation and is modulated by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Cell Biol* **176**, 263–268.

**Snow, J. W. and Orkin, S. H.** (2009). Translational isoforms of FOG1 regulate GATA1-interacting complexes. *J Biol Chem* **284**, 29310–29319.

**Snow, J. W., Kim, J., Currie, C. R., Xu, J. and Orkin, S. H.** (2010). Sumoylation regulates interaction of FOG1 with C-terminal-binding protein (CTBP). *J Biol Chem* **285**, 28064–28075.

**Soleimani, A. F., Zulkifli, I., Hair-Bejo, M., Omar, A. R. and Raha, A. R.** (2012). The role of heat shock protein 70 in resistance to *Salmonella enteritidis* in broiler chickens subjected to neonatal feed restriction and thermal stress. *Poult Sci* **91**, 340–345.

**Spektor, A., Tsang, W. Y., Khoo, D. and Dynlacht, B. D.** (2007). Cep97 and CP110 Suppress a Cilia Assembly Program. *Cell* **130**, 678–690.

**Srikanth, C. V., Wall, D. M., Maldonado-Contreras, A., Shi, H. N., Zhou, D., Demma, Z., Mumy, K. L. and McCormick, B. A.** (2010). *Salmonella* pathogenesis and processing of secreted effectors by caspase-3. *Science (80- )* **330**, 390–393.

**Srikanth, C. V., Mercado-Lubo, R., Hallstrom, K. and McCormick, B. A.** (2011). *Salmonella* effector proteins and host-cell responses. *Cell Mol Life Sci* **68**, 3687–3697.

**Stark, H., Dube, P., Lüührmann, R. and Kastner, B.** (2001). Arrangement of RNA and proteins in the spliceosomal U1 small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature* **409**, 539–542.

**Steele-Mortimer, O.** (2008). The *Salmonella*-containing vacuole-Moving with the times. *Curr Opin Microbiol* **11**, 38–45.

- Steele-Mortimer, O., Knodler, L. A., Marcus, S. L., Scheid, M. P., Goh, B., Pfeifer, C. G., Duronio, V. and Finlay, B. B.** (2000). Activation of Akt/protein kinase B in epithelial cells by the *Salmonella typhimurium* effector SigD. *J Biol Chem* **275**, 37718–37724.
- Stender, S., Friebel, A., Linder, S., Rohde, M., Miroid, S. and Hardt, W. D.** (2000). Identification of SopE2 from *Salmonella typhimurium*, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell. *Mol Microbiol* **36**, 1206–1221.
- Stewart, M. K., Cummings, L. A., Johnson, M. L., Berezow, A. B. and Cookson, B. T.** (2011). Regulation of phenotypic heterogeneity permits *Salmonella* evasion of the host caspase-1 inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 20742–20747.
- Sun, Y. H., Rolán, H. G. and Tsolis, R. M.** (2007). Injection of flagellin into the host cell cytosol by *Salmonella enterica* serotype typhimurium. *J Biol Chem* **282**, 33897–33901.
- Szeto, J., Namolovan, A., Osborne, S. E., Coombes, B. K. and Brumell, J. H.** (2009). *Salmonella*-containing vacuoles display centrifugal movement associated with cell-to-cell transfer in epithelial cells. *Infect Immun* **77**, 996–1007.
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., et al.** (2019). STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res* **47**, D607–D613.
- Takaya, A., Kubota, Y., Isogai, E. and Yamamoto, T.** (2005). Degradation of the HilC and HilD regulator proteins by ATP-dependent Lon protease leads to downregulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Mol Microbiol* **55**, 839–852.
- Tampakaki, A. P., Fadouloglou, V. E., Gazi, A. D., Panopoulos, N. J. and Kokkinidis, M.** (2004). Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol* **6**, 805–816.
- Tan, H., Liao, H., Zhao, L., Lu, Y., Jiang, S., Tao, D., Liu, Y. and Ma, Y.** (2017). HILI destabilizes microtubules by suppressing phosphorylation and Gigaxonin-mediated degradation of TBCB. *Sci Rep* **7**, 46376.
- Teixidó, L., Carrasco, B., Alonso, J. C., Barbé, J. and Campoy, S.** (2011). Fur activates the expression of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 by directly interacting with the *hilD* operator *in vivo* and *in vitro*. *PLoS One* **6**,
- Terebiznik, M. R., Vieira, O. V., Marcus, S. L., Slade, A., Yips, C. M., Trimble, W. S., Meyer, T., Finlay, B. B. and Grinstein, S.** (2002). Elimination of host cell PtdIns(4, 5)P<sub>2</sub> by bacterial SigD promotes membrane fission during invasion by *Salmonella*. *Nat Cell Biol* **4**, 766–773.
- Thomas, S., Holland, I. B. and Schmitt, L.** (2014). The Type 1 secretion pathway - The hemolysin system and beyond. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1843**, 1629–1641.
- Tian, G., Huang, Y., Rommelaere, H., Vandekerckhove, J., Ampe, C. and Cowan, N. J.** (1996). Pathway leading to correctly folded  $\beta$ -tubulin. *Cell* **86**, 287–296.
- Tindall, B. J., Grimont, P. A. D., Garrity, G. M. and Euzéby, J. P.** (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 521–524.
- Tischler, A. D. and McKinney, J. D.** (2010). Contrasting persistence strategies in *Salmonella* and *Mycobacterium*. *Curr Opin Microbiol* **13**, 93–99.



- Townsend, S. M., Kramer, N. E., Edwards, R., Baker, S., Hamlin, N., Simmonds, M., Stevens, K., Maloy, S., Parkhill, J., Dougan, G., et al.** (2001). *Salmonella enterica* serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. *Infect Immun* **69**, 2894–2901.
- Troxell, B., Sikes, M. L., Fink, R. C., Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J. and Hassan, H. M.** (2011). Fur negatively regulates *hns* and is required for the expression of *hila* and virulence in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol* **193**, 497–505.
- Tsolis, R. M., Townsend, S. M., Miao, E. A., Miller, S. I., Ficht, T. A., Adams, L. G. and Bäumler, A. J.** (1999). Identification of a putative *Salmonella enterica* serotype Typhimurium host range factor with homology to IpaH and YopM by signature-tagged mutagenesis. *Infect Immun* **67**, 6385–6393.
- Tuteja, N., Tuteja, R., Ochem, A., Taneja, P., Huang, N. W., Simoncsits, A., Susic, S., Rahman, K., Marusic, L., Chen, J., et al.** (1994). Human DNA helicase II: A novel DNA unwinding enzyme identified as the Ku autoantigen. *EMBO J* **13**, 4991–5001.
- Uhlen, M., Zhang, C., Lee, S., Sjöstedt, E., Fagerberg, L., Bidkhori, G., Benfeitas, R., Arif, M., Liu, Z., Edfors, F., et al.** (2017). A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science (80- )* **357**,.
- Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S. and Bossi, L.** (2001). Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 15264–15269.
- V, K. and M, H.** (2004). Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *Cell Mol Life Sci* **61**, 2812–2826.
- Vadlamudi, R. K., Barnes, C. J., Rayala, S., Li, F., Balasenthil, S., Marcus, S., Goodson, H. V., Sahin, A. A. and Kumar, R.** (2005). p21-Activated Kinase 1 Regulates Microtubule Dynamics by Phosphorylating Tubulin Cofactor B. *Mol Cell Biol* **25**, 3726–3736.
- Vadlamudi, R. K., Barnes, C. J., Rayala, S., Li, F., Balasenthil, S., Marcus, S., Goodson, H. V., Sahin, A. A. and Kumar, R.** (2013). p21-Activated Kinase 1 Regulates Microtubule Dynamics by Phosphorylating Tubulin Cofactor B. *Mol Cell Biol* **33**, 1267–1267.
- Van Aelst, L.** (1998). Two-hybrid analysis of Ras-Raf interactions. *Methods Mol Biol* **84**, 201–222.
- van der Velden, A. W. M., Velasquez, M. and Starnbach, M. N.** (2003). *Salmonella* Rapidly Kill Dendritic Cells via a Caspase-1- Dependent Mechanism. *J Immunol* **171**, 6742–6749.
- Veith, P. D., Glew, M. D., Gorasia, D. G. and Reynolds, E. C.** (2017). Type IX secretion: the generation of bacterial cell surface coatings involved in virulence, gliding motility and the degradation of complex biopolymers. *Mol Microbiol* **106**, 35–53.
- Vernikos, G. S. and Parkhill, J.** (2006). Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: Revisiting the *Salmonella* pathogenicity islands. *Bioinformatics* **22**, 2196–2203.
- Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M. L., Lazdunski, A., Wu, L. F. and Filloux, A.** (2001). Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *EMBO J* **20**, 6735–6741.
- Wagner, C. and Hensel, M.** (2011). Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. *Adv Exp Med*

*Biol* **715**, 17–34.

**Waksman, G. and Hultgren, S. J.** (2009). Structural biology of the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Nat Rev Microbiol* **7**, 765–774.

**Wall, D. M., Nadeau, W. J., Pazos, M. A., Shi, H. N., Galyov, E. E. and McCormick, B. A.** (2007). Identification of the *Salmonella enterica* serotype Typhimurium SipA domain responsible for inducing neutrophil recruitment across the intestinal epithelium. *Cell Microbiol* **9**, 2299–2313.

**Walter, B. M., Nordhoff, C., Varga, G., Goncharenko, G., Schneider, S. W., Ludwig, S. and Wixler, V.** (2012). Mss4 protein is a regulator of stress response and apoptosis. *Cell Death Dis* **3**,.

**Walthers, D., Carroll, R. K., Navarre, W. W., Libby, S. J., Fang, F. C. and Kenney, L. J.** (2007). The response regulator SsrB activates expression of diverse *Salmonella* pathogenicity island 2 promoters and counters silencing by the nucleoid-associated protein H-NS. *Mol Microbiol* **65**, 477–493.

**Walthers, D., Li, Y., Liu, Y., Anand, G., Yan, J. and Kenney, L. J.** (2011). *Salmonella enterica* response regulator SsrB relieves H-NS silencing by displacing H-NS bound in polymerization mode and directly activates transcription. *J Biol Chem* **286**, 1895–1902.

**Wang, C., Hayashi, H., Harrison, R., Chiu, B., Chan, J. R., Ostergaard, H. L., Inman, R. D., Jongstra, J., Cybulsky, M. I. and Jongstra-Bilen, J.** (2002). Modulation of Mac-1 (CD11b/CD18)-Mediated Adhesion by the Leukocyte-Specific Protein 1 Is Key to Its Role in Neutrophil Polarization and Chemotaxis. *J Immunol* **169**, 415–423.

**Wang, W., Ding, J., Allen, E., Zhu, P., Zhang, L., Vogel, H. and Yang, Y.** (2005). Gigaxonin interacts with tubulin folding cofactor B and controls its degradation through the ubiquitin-proteasome pathway. *Curr Biol* **15**, 2050–2055.

**Warde-Farley, D., Donaldson, S. L., Comes, O., Zuberi, K., Badrawi, R., Chao, P., Franz, M., Grouios, C., Kazi, F., Lopes, C. T., et al.** (2010). The GeneMANIA prediction server: Biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res* **38**,.

**Wasylnka, J. A., Bakowski, M. A., Szeto, J., Ohlson, M. B., Trimble, W. S., Miller, S. I. and Brumell, J. H.** (2008). Role for myosin II in regulating positioning of *Salmonella*-containing vacuoles and intracellular replication. *Infect Immun* **76**, 2722–2735.

**Watanabe, T. K., Shimizu, F., Nagata, M., Kawai, A., Fujiwara, T., Nakamura, Y., Takahashi, E. and Hirai, Y.** (1996). Cloning, expression, and mapping of CKAPI, which encodes a putative cytoskeleton-associated protein containing a CAP-GLY domain. *Cytogenet Cell Genet* **72**, 208–11.

**Webster, D. R. and Borisy, G. G.** (1989a). Microtubules are acetylated in domains that turn over slowly. *J Cell Sci* **92** ( Pt 1), 57–65.

**Webster, D. R. and Borisy, G. G.** (1989b). Microtubules are acetylated in domains that turn over slowly. *J Cell Sci* **92** ( Pt 1), 57–65.

**Weisbrich, A., Honnappa, S., Jaussi, R., Okhrimenko, O., Frey, D., Jelesarov, I., Akhmanova, A. and Steinmetz, M. O.** (2007). Structure-function relationship of CAP-Gly domains. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 959–967.

- Wille, T., Wagner, C., Mittelstädt, W., Blank, K., Sommer, E., Malengo, G., Döhler, D., Lange, A., Sourjik, V., Hensel, M., et al. (2014). SiiA and siib are novel type I secretion system subunits controlling SPI4-mediated adhesion of *Salmonella enterica*. *Cell Microbiol* **16**, 161–178.
- Winter, S. E., Thiennimitr, P., Winter, M. G., Butler, B. P., Huseby, D. L., Crawford, R. W., Russell, J. M., Bevins, C. L., Adams, L. G., Tsolis, R. M., et al. (2010). Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature* **467**, 426–429.
- Wixler, V., Wixler, L., Altenfeld, A., Ludwig, S., Goody, R. S. and Itzen, A. (2011). Identification and characterisation of novel Mss4-binding Rab GTPases. *Biol Chem* **392**, 239–248.
- Wood, M. W., Jones, M. A., Watson, P. R., Hedges, S., Wallis, T. S. and Galyov, E. E. (1998). Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. *Mol Microbiol* **29**, 883–891.
- Worley, M. J., Ching, K. H. L. and Heffron, F. (2000). *Salmonella* SsrB activates a global regulon of horizontally acquired genes. *Mol Microbiol* **36**, 749–761.
- Worrall, L. J., Hong, C., Vuckovic, M., Deng, W., Bergeron, J. R. C., Majewski, D. D., Huang, R. K., Spreter, T., Finlay, B. B., Yu, Z., et al. (2016). Near-atomic-resolution cryo-EM analysis of the *Salmonella* T3S injectisome basal body. *Nature* **540**, 597–601.
- Wu, S., Ye, Z., Liu, X., Zhao, Y., Xia, Y., Steiner, A., Petrof, E. O., Claud, E. C. and Sun, J. (2010). *Salmonella* typhimurium infection increases p53 acetylation in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* **298**,.
- Wu, H., Jones, R. M. and Neish, A. S. (2012). The *Salmonella* effector AvrA mediates bacterial intracellular survival during infection *in vivo*. *Cell Microbiol* **14**, 28–39.
- Wurzenberger, C., Held, M., Lampson, M. A., Poser, I., Hyman, A. A. and Gerlich, D. W. (2012). Sds22 and repo-man stabilize chromosome segregation by counteracting Aurora B on anaphase kinetochores. *J Cell Biol* **198**, 173–183.
- Xu, D., Holko, M., Sadler, A. J., Scott, B., Higashiyama, S., Berkofsky-Fessler, W., McConnell, M. J., Pandolfi, P. P., Licht, J. D. and Williams, B. R. G. (2009). Promyelocytic Leukemia Zinc Finger Protein Regulates Interferon-Mediated Innate Immunity. *Immunity* **30**, 802–816.
- Xu, C., Liu, X., Zha, H., Fan, S., Zhang, D., Li, S. and Xiao, W. (2018). A pathogen-derived effector modulates host glucose metabolism by arginine GlcNAcylation of HIF-1 $\alpha$  protein. *PLoS Pathog* **14**,.
- Xue, J., Pan, X., Peng, T., Duan, M., Du, L., Zhuang, X., Cai, X., Yi, X., Fu, Y. and Li, S. (2020). Auto Arginine-GlcNAcylation Is Crucial for Bacterial Pathogens in Regulating Host Cell Death. *Front Cell Infect Microbiol* **10**, 197.
- Yang, Z., Soderholm, A., Lung, T. W. F., Giogha, C., Hill, M. M., Brown, N. F., Hartland, E. and Teasdale, R. D. (2015). SseK3 Is a *Salmonella* Effector That Binds TRIM32 and Modulates the Host's NF- $\kappa$ B Signalling Activity. *PLoS One* **10**, e0138529.
- Yang, Y., Yu, C., Ding, K., Zhang, C., Liao, C., Jia, Y., Li, J. and Cheng, X. (2018). Role of the sseK1 gene in the pathogenicity of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis *in vitro* and *in vivo*. *Microb Pathog* **117**, 270–275.

- Ye, Z., Petrof, E. O., Boone, D., Claud, E. C. and Sun, J.** (2007). *Salmonella* effector AvrA regulation of colonic epithelial cell inflammation by deubiquitination. *Am J Pathol* **171**, 882–892.
- Yin, S., Yu, J., Hu, B., Lu, C., Liu, X., Gao, X., Li, W., Zhou, L., Wang, J., Wang, D., et al.** (2018). Runx3 mediates resistance to intracellular bacterial infection by promoting IL12 signaling in group 1 ILC and NCR+ILC3. *Front Immunol* **9**,.
- Yoon, H., Lim, S., Heu, S., Choi, S. and Ryu, S.** (2003). Proteome analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *fis* mutant. *FEMS Microbiol Lett* **226**, 391–396.
- Yu, X. J., Liu, M. and Holden, D. W.** (2004). SsaM and SpiC interact and regulate secretion of *Salmonella* Pathogenicity Island 2 type III secretion system effectors and translocators. *Mol Microbiol* **54**, 604–619.
- Yu, X. J., McGourty, K., Liu, M., Unsworth, K. E. and Holden, D. W.** (2010). pH sensing by intracellular *Salmonella* induces effector translocation. *Science (80- )* **328**, 1040–1043.
- Yu, X. J., Liu, M., Matthews, S. and Holden, D. W.** (2011). Tandem translation generates a chaperone for the *Salmonella* type III secretion system protein SsaQ. *J Biol Chem* **286**, 36098–36107.
- Zhang, X., Champion, E. A., Tran, E. J., Brown, B. A., Baserga, S. J. and Stuart Maxwell, E.** (2006a). The coiled-coil domain of the Nop56/58 core protein is dispensable for sRNP assembly but is critical for archaeal box C/D sRNP-guided nucleotide methylation. *RNA* **12**, 1092–1103.
- Zhang, Y., Higashide, W. M., McCormick, B. A., Chen, J. and Zhou, D.** (2006b). The inflammation-associated *Salmonella* SopA is a HECT-like E3 ubiquitin ligase. *Mol Microbiol* **62**, 786–793.
- Zhang, S., Lillehoj, H. S., Kim, C. H., Keeler, C. L., Babu, U. and Zhang, M. Z.** (2008). Transcriptional response of chicken macrophages to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection. In *Developments in Biologicals*, pp. 141–151. S. Karger AG.
- Zhang, Y., Wu, S., Ma, J., Xia, Y., Ai, X. and Sun, J.** (2015a). Bacterial protein AvrA stabilizes intestinal epithelial tight junctions via blockage of the C-jun N-terminal kinase pathway. *Tissue Barriers* **3**,.
- Zhang, T., Dong, K., Liang, W., Xu, D., Xia, H., Geng, J., Najafov, A., Liu, M., Li, Y., Han, X., et al.** (2015b). G-protein Coupled Receptors Regulate Autophagy by ZBTB16-mediated Ubiquitination and Proteasomal Degradation of Adaptor Protein Atg14L. *Elife* **2015**,.
- Zhang, X., He, L., Zhang, C., Yu, C., Yang, Y., Jia, Y., Cheng, X., Li, Y., Liao, C., Li, J., et al.** (2019). The impact of sseK2 deletion on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence *in vivo* and *in vitro*. *BMC Microbiol* **19**,.
- Zhou, D., Mooseker, M. S. and Galán, J. E.** (1999). An invasion-associated *Salmonella* protein modulates the actin-bundling activity of plastin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10176–10181.
- Zitouni, S., Nabais, C., Jana, S. C., Guerrero, A. and Bettencourt-Dias, M.** (2014). Polo-like kinases: Structural variations lead to multiple functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 433–452.

**Zouhir, S., Bernal-Bayard, J., Cordero-Alba, M., Cardenal-Muñoz, E., Guimaraes, B., Lazar, N., Ramos-Morales, F. and Nessler, S. (2014).** The structure of the SlrP-Trx1 complex sheds light on the autoinhibition mechanism of the type III secretion system effectors of the NEL family. *Biochem J* **464**, 135–144.