



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE

BIOMEDICINA MOLECULAR

“Evaluación del papel de la proteína SipB de
Salmonella Typhimurium en la infección de linfocitos B.”

TESIS

Que presenta

I.Q. REBECA CESSA HERNÁNDEZ

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

BIOMEDICINA MOLECULAR

Director de la Tesis:

Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete.

Ciudad de México.

Agosto, 2016.

La autora de este trabajo está adscrita al Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional y fue apoyada con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología durante la realización del mismo, con el número de CVU 634657 y con el número de becario 340638.

Agradecimientos

Al Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete por brindarme la oportunidad de trabajar y aprender en su laboratorio. Gracias por su tiempo, observaciones y consejos.

A mis compañeros de laboratorio y amigos: Angélica, Abraham, Carlos Samuel, Soledad, María, Juan Carlos, Rocío, Noni, Julio, Carla, Antonio y Luis Uriel por compartir sus conocimientos conmigo y por brindarme su invaluable ayuda. Gracias también a Jesús, Benjamín y Orestes por su apoyo en todo momento.

Por último, pero no menos importante, gracias a mi familia, sin ustedes no habría sido posible alcanzar esta meta.

Gracias.

INDICE.

INDICE.....	I
INDICE DE FIGURAS.	III
ABREVIATURAS.....	IV
RESUMEN.	1
ABSTRACT.....	1
INTRODUCCION.....	3
<i>Salmonella</i>	3
Infección por <i>Salmonella</i>	3
Las islas de patogenicidad de <i>Salmonella</i>	5
Los dos sistemas de secreción tipo tres (SST3) asociados a virulencia.	6
El operón Sip.	8
Las funciones conocidas de SipB.	8
ANTECEDENTES.	10
La muerte celular de macrófagos inducida por <i>Salmonella</i> depende de SipB.....	10
Los blancos de <i>Salmonella</i>	11
<i>Salmonella</i> no induce piroptosis en las células B.....	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.	13
HIPÓTESIS.	14
OBJETIVOS.....	15
Objetivo general.....	15
Objetivos particulares.	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
Bacterias y condiciones de cultivo.	16
Purificación de linfocitos B de bazo.	16
Obtención de macrófagos derivados de médula ósea (MDMO).	16
Ensayos de infección y sobrevivencia <i>in vitro</i>	17
Detección de Caspasa-1.	18
Análisis estadístico.	18
RESULTADOS.	19
La proteína SipB de <i>Salmonella</i> Typhimurium participa en la invasión eficiente de linfocitos B.	19

SipB no altera la capacidad de <i>Salmonella</i> de sobrevivir en linfocitos B.	21
Caspasa-1 no es activada por la proteína SipB de <i>Salmonella</i> en linfocitos B infectados.	23
La citotoxicidad inducida por <i>Salmonella</i> en linfocitos B es independiente de SipB.	24
DISCUSION.....	25
REFERENCIAS.....	29

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Biología de la infección por <i>Salmonella</i>	4
Figura 2. Islas de patogenicidad de <i>Salmonella</i>	6
Figura 3. Estructura del SST3.....	7
Figura 4. La ausencia de SipB altera la capacidad invasora de <i>Salmonella</i>	20
Figura 5. La ausencia de SipB afecta el número de UFCs recuperadas de linfocitos B a diferentes horas post-infección.....	21
Figura 6. SipB no altera la capacidad de <i>Salmonella</i> de sobrevivir en linfocitos B.....	22
Figura 7. Caspasa-1 no es activada por la proteína SipB de <i>Salmonella</i> en linfocitos B infectados..	23
Figura 8. Sipb no tiene un papel en la inducción de muerte celular en linfocitos B.....	24

ABREVIATURAS.

a.a	Aminoácidos.
CA	Complejo de aguja.
CD	Célula dendrítica.
GLM	Ganglios linfáticos mesentéricos.
IL-8	Interleucina-8.
IPS	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i> .
LB	Luria Bertani.
LPS	Lipopolisacárido.
MDMO	Macrófagos derivados de médula ósea.
MOI	Multiplicity of infection.
NTS	Nontyphoidal <i>Salmonella</i> .
PP	Placas de Peyer.
SFB	Suero fetal bovino.
SipB	<i>Salmonella</i> invasion protein B.
SopB	<i>Salmonella</i> outer protein B.
SopE	<i>Salmonella</i> outer protein E.
SopE2	<i>Salmonella</i> outer protein E2.
SST3	Sistema de secreción tipo 3.
TLR	Toll-like receptor.
UFC	Unidades formadoras de colonias.
VCS	Vacuola contenedora de <i>Salmonella</i> .
WT	Wild type.

ABSTRACT.

Salmonella are able to infect and survives within the B cell, however, the bacterial elements responsible for the modulation of processes that favor the prevalence of bacteria within this are still not exactly determined. In this paper we show that *Salmonella* Typhimurium SipB protein is involved in efficient B cell invasion as a member of the type III secretion system encoded in the pathogenicity island 1 of *Salmonella*. Furthermore, we found that SipB not alter the ability of *Salmonella* to survive in the B cell and that, contrary to what has been proven in macrophages, Caspase-1 is not activated by SipB during B cell infection.

RESUMEN.

Salmonella puede infectar y sobrevivir dentro del linfocito B, sin embargo, aún no se determinan con exactitud los elementos bacterianos responsables de la modulación de los procesos que favorecen la prevalencia de la bacteria dentro de este. En este trabajo demostramos que la proteína SipB de *Salmonella* Typhimurium participa en la invasión eficiente del linfocito B formando parte del Sistema de secreción tipo III codificado en la Isla de patogenicidad 1 de *Salmonella*. Además, encontramos que SipB no altera la capacidad de *Salmonella* de sobrevivir en el linfocito B y que, al contrario de lo que se ha probado en macrófagos, Caspasa-1 no es activada por SipB durante la infección del linfocito B.

INTRODUCCION.

Salmonella.

Salmonella es una bacteria intracelular Gram-negativa que causa enfermedades entéricas en humanos y animales. El género *Salmonella* se divide en dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* comprende más de 2,500 serovares los cuales se clasifican de acuerdo a diversas estructuras antigénicas de superficie, como el antígeno O (un componente del lipopolisacárido [LPS]) y los antígenos flagelares [1].

Salmonella serotipo Typhi y *Salmonella* serotipo Paratyphi (los serovares tifoideos) son patógenos restringidos a humanos que causan la enfermedad sistémica llamada fiebre entérica (fiebre tifoidea), que se caracteriza por fiebre y dolor abdominal. Las cepas no tifoideas (NTS), *Salmonella* serotipo Enteritidis y *Salmonella* serotipo Typhimurium, son patógenos que pueden infectar un amplio rango de hospederos. Estas cepas causan una gastroenteritis aguda y auto-limitada en humanos, ganado, cerdos y aves de corral, caracterizada por náusea, vómito y diarrea que se presentan típicamente de 1 a 48 horas después de la ingesta de comida o agua contaminada, pero también pueden causar bacteremia e infección sistémica en hospederos inmunosuprimidos, en individuos muy jóvenes o viejos y ocasionalmente en humanos y animales adultos y sanos [2].

Los ratones infectados con *S. Typhimurium* desarrollan una enfermedad tipo fiebre tifoidea con diseminación sistémica de la bacteria pero sin diarrea, por lo tanto son utilizados como modelo animal para el estudio de la enfermedad [3].

Infección por *Salmonella*.

Salmonella usualmente se adquiere por ingestión oral de alimentos o agua contaminados y sobrevive a la acidez gástrica para ganar acceso al epitelio intestinal [4].

El primer obstáculo a superar en el hospedero es entonces el pH ácido del estómago. Para protegerse del severo shock causado por el ácido, *S. Typhimurium* activa la respuesta de tolerancia al ácido, que proporciona la función inducible de mantener el pH intracelular a valores más altos que los del medio extracelular. Después de entrar en el intestino delgado, *Salmonella* debe alcanzar y atravesar la capa de moco intestinal antes de encontrarse y adherirse a las células epiteliales intestinales [5].

Salmonella requiere atravesar el epitelio intestinal, hasta el momento se han descrito tres formas en que lo hace: preferentemente entra por las células M (microfold) que son células

epiteliales intestinales que muestrean antígenos por pinocitosis y los transportan a las células linfoides que se encuentran en las placas de Peyer (PP) subyacentes [6]. Ver figura 1.

La segunda forma de entrar es mediando su propia endocitosis, *Salmonella* tiene la habilidad de invadir los enterocitos no fagocíticos del epitelio intestinal. Después de adherirse a la superficie apical de las células, usando varias adhesinas, la bacteria rompe el borde epitelial y usa el Sistema de secreción tipo 3 (SST3) codificado en la Isla de patogenicidad de *Salmonella* 1 (IPS1) [7, 8, 9].

Se requiere de la acción de al menos cinco efectores de la IPS1 del SST3 para la invasión eficiente de células epiteliales en cultivo, a pesar de que la invasión óptima en tejidos animales podría ser más complicada y diversa. SopE, SopE2 y SopB activan a las Rho GTPasas del hospedero: Cdc42, Rac1 y RhoG, lo que da lugar a la reorganización del citoesqueleto, el ruffling membranal y a la internalización de la bacteria por macropinocitosis [10, 11, 12].

El tercer modo es a través de las células dendríticas (CDs) que pueden extender sus dendritas desde la lámina propia a través del moco intestinal. Como las CDs son células fagocíticas, pueden tomar por este medio tanto bacteria invasiva como no invasiva. Para que se lleve a cabo el proceso se requiere la expresión del receptor de quimiocinas CX3CR1 por las CDs y la señalización vía Toll-like-receptor (TLR) por las células epiteliales [45].

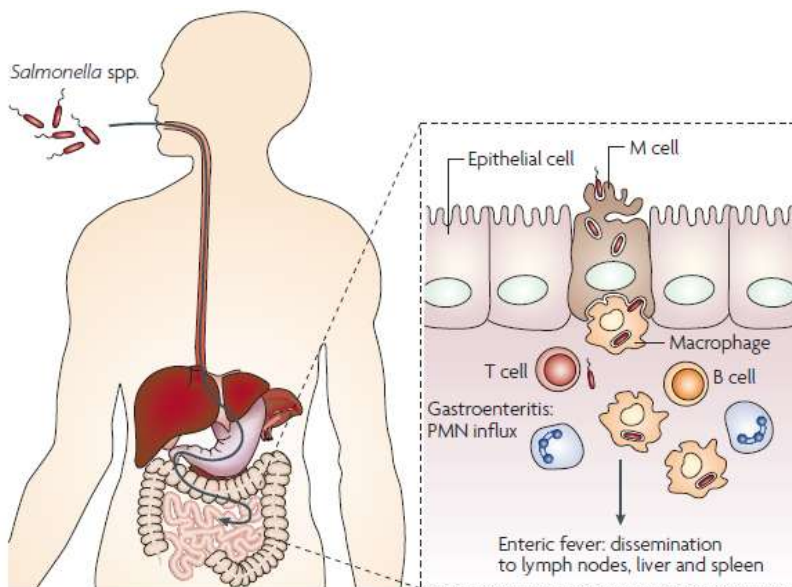


Figura 1. Biología de la infección por *Salmonella*. La *Salmonella* ingerida oralmente sobrevive al pH ácido del estómago y evade las múltiples defensas del intestino delgado para llegar al epitelio. *Salmonella* preferentemente entra a través de las células M, las cuales la transportan hasta los linfocitos T y B que se encuentran en las placas de Peyer

subyacentes. Una vez que atraviesa el epitelio, los serotipos de *Salmonella* que están asociados con la enfermedad sistémica son ingeridos por macrófagos y diseminados por el sistema retículo endotelial. Por el contrario, los serotipos no tifoideos de *Salmonella* inducen una respuesta inflamatoria temprana, caracterizada por la infiltración de leucocitos polimorfo nucleares dentro del lumen intestinal y diarrea [29].

Una vez que *Salmonella* atraviesa el epitelio intestinal, es endocitada por fagocitos. Se han reportado tres tipos de fagocitos que interactúan con esta bacteria: neutrófilos, macrófagos, y células dendríticas. Los dos primeros tipos son reclutados de la sangre en respuesta a las señales inflamatorias (IL-8). En términos generales, ya que la mayoría de las células bacterianas ha atravesado el epitelio a través de las células M, llegan directamente a las PP y luego a los ganglios linfáticos mesentéricos (GLMs) a través de la linfa intestinal, probablemente siendo transportadas por las células fagocíticas [13, 14, 15].

Cuando la bacteria es fagocitada se localiza dentro de las vacuolas contenedoras de *Salmonella* (VCS). Las VCSs están integradas inicialmente dentro de la vía endocítica temprana, sin embargo, necesitan ser desacopladas después para evitar la eventual fusión con lisosomas secundarios y sobrevivir a la entrega de enzimas lisosomales. Esta acción depende de los cambios dirigidos por *Salmonella* en el tráfico endocítico del hospedero [16, 17]. Durante la maduración de las VCS, *Salmonella* induce la formación *de novo* de una malla de F-actina alrededor de vacuolas bacterianas, un proceso que se denomina polimerización de actina asociada a la vacuola y es importante para el mantenimiento de la integridad de la membrana de la vacuola [18]. Las VCSs a continuación, migran a una posición perinuclear, en estrecha proximidad con el aparato de Golgi, presumiblemente para facilitar la interceptación de vesículas endo y exocíticas para obtener nutrientes y / o fragmentos de membrana. Este evento parece ser esencial para la replicación bacteriana [19, 20].

Una vez que *Salmonella* ha invadido los fagocitos, la migración de estos, predominantemente macrófagos, facilita la diseminación sistémica de las bacterias a través del torrente sanguíneo a diversos tejidos adicionales, tales como el bazo y el hígado, donde este patógeno se replica preferentemente [21].

Las islas de patogenicidad de *Salmonella*.

La mayoría de los genes que codifican a los factores de virulencia más importantes de *Salmonella* se localizan en las altamente conservadas islas de patogenicidad de *Salmonella*. Hasta el momento, se han identificado 5 IPS (IPS1- IPS5) como claramente involucradas en la virulencia de *S. Typhimurium* [22]. Ver figura 2.

La IPS1 se requiere para la invasión de las células epiteliales del intestino, mientras que la IPS2, 3 y 4 se requieren para el crecimiento y supervivencia de la bacteria dentro del hospedero, manifestándose en la fase sistémica de la enfermedad. Recientemente se han identificado factores de virulencia codificados en la IPS5 que parecen mediar la inflamación y la secreción de cloro que caracteriza la fase entérica de la enfermedad. Tanto la IPS1 como la IPS2 codifican sistemas de secreción tipo 3, que median la translocación de las proteínas al citosol de la célula del hospedero [23].

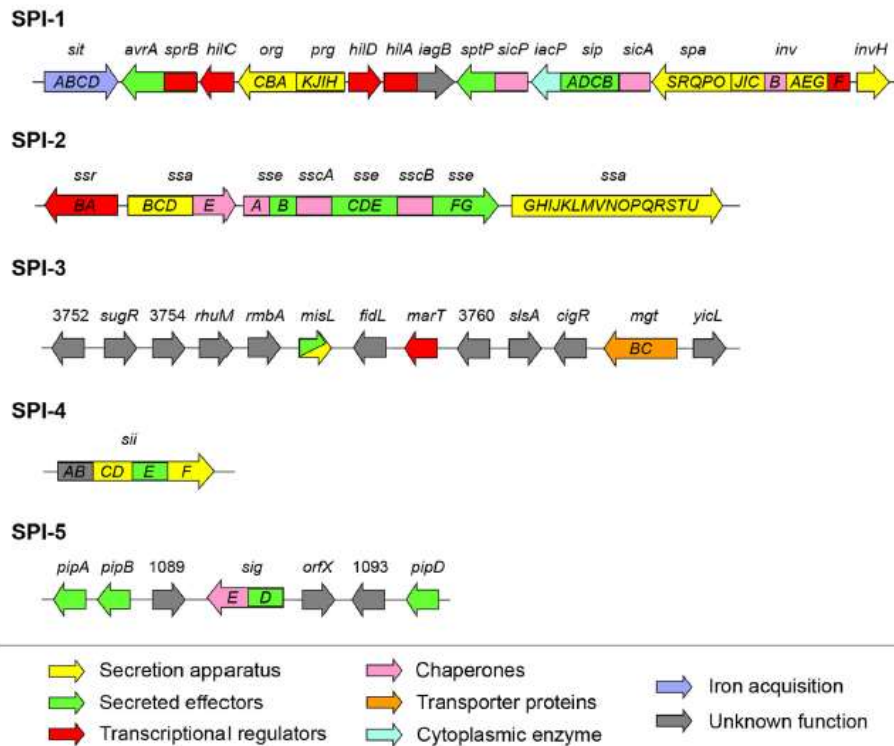


FIG 2 Schematic representation of the genes carried within the five SPIs and their putative functions.

Figura 2. Islas de patogenicidad de *Salmonella*. Representación esquemática de los genes codificados en las cinco IPS y sus funciones putativas [24].

Los dos sistemas de secreción tipo tres (SST3) asociados a virulencia.

Muchos patógenos bacterianos han desarrollado mecanismos para entrar, sobrevivir y replicarse dentro de células no fagocíticas. Alcanzar el compartimento intracelular constituye una característica esencial para el ciclo de vida del patógeno ya que este ambiente puede protegerlo del sistema inmune del hospedero, proveerle nutrientes para asegurar su crecimiento, o simplemente permitirle ganar acceso a tejidos más profundos. Los mecanismos de entrada involucran una manipulación sofisticada de la maquinaria celular del hospedero [25].

El sistema de secreción tipo 3 es un aparato especializado esencial para la patogénesis de *Salmonella* y para la colonización de los tejidos del hospedero. Este sistema media la transferencia de proteínas de virulencia, conocidas como efectores, desde la célula bacteriana hacia el citoplasma de la célula del hospedero [26]. Una vez dentro de la célula eucariota, estos efectores pueden afectar las funciones celulares del hospedero, como la arquitectura del citoesqueleto, el tráfico de membranas, la transducción de señales y la

expresión de genes de citocinas, para promover la sobrevivencia bacteriana y la colonización [27, 28].

Salmonella codifica dos SST3 diferentes en las islas de patogenicidad de *Salmonella* 1 y 2 (IPS1 e IPS2) que funcionan en tiempos distintos durante la infección [26]. Mientras el SST3 codificado en la IPS1 se activa al contacto con la célula del hospedero y transloca proteínas bacterianas a través de la membrana plasmática, el SST3 de la IPS2 se expresa en el fagosoma y transloca efectores a través de la membrana vacuolar. Se ha mostrado que el SST3 de la IPS1 se requiere para la invasión de células no fagocíticas, la inducción de respuestas intestinales inflamatorias y diarrea, así como la colonización del intestino. La IPS2, por el contrario, tiene un papel importante en la sobrevivencia bacteriana en macrófagos y el establecimiento de la enfermedad sistémica [29].

El SST3 de la IPS1 está formado por más de 20 proteínas, algunas de las cuales forman una estructura supramolecular conocida como el complejo de aguja (CA).

El CA consiste en una base de varios anillos que abarca las membranas interna y externa de la bacteria y una barra interna que une los anillos [27, 28]. Extracelularmente se encuentran las proteínas que forman la aguja seguidas de un complejo de proteínas en la punta y por último, un par de proteínas formando el translocón, que está involucrado en la translocación de efectores formando un poro en la membrana celular del hospedero [30]. Ver figura 3.

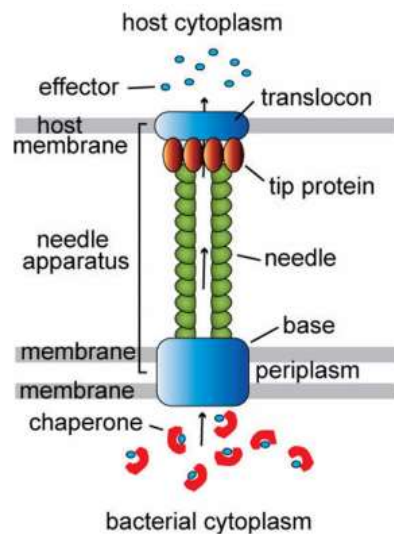


Figura 3. Estructura del SST3. El SST3 está formado por proteínas estructurales y no estructurales [46].

Todos los genes que se requieren para el ensamblaje y función del CA se localizan en la IPS1, en un cluster de 40-kb en el centrisoma 63 del cromosoma de *S. Typhimurium*. Los genes

codificados en la IPS1 pueden agruparse de acuerdo a su función, ya sea basándose en la evidencia experimental o asumiendo en base a la función de sus homólogos en otros SST3. Se pueden agrupar como sigue: i) componentes del aparato de exportación, ii) componentes estructurales del CA, iii) translocón, iv) reguladores, v) efectores y vi) chaperonas [30].

Se sabe que las proteínas efectoras contienen una señal localizada en su extremo amino que las dirige al SST3 [31]. Además de esta corta señal de secreción, muchos efectores tienen un sitio de unión para una chaperona específica, que se cree sirve para estabilizar y dirigir al efector al aparato de translocación. En la base del CA se localiza una ATPasa que además de dirigir el proceso de exportación también facilita la liberación de los efectores de las chaperonas [32].

El operón Sip.

En 1995, por medio de estudios de mutagénesis, se identificó un grupo de genes de virulencia de *Salmonella* localizados en un operón en el centrisoma 63. A este operón se le denominó Sip (*Salmonella* invasion protein) y contiene 5 genes: *sipE*, *sipB*, *sipC*, *sipD* y *sipA* [33].

Hay dos efectores del SST3 de la IPS1 que promueven la internalización de la bacteria uniéndose a actina y modulando directamente la dinámica de ésta. SipA ayuda a iniciar la polimerización de actina en el sitio de entrada de *S. Typhimurium*, lo hace disminuyendo la concentración crítica e incrementando la estabilidad de los filamentos de actina, mientras que SipC, un efector que también funciona como translocón, se inserta en la membrana plasmática de las células del hospedero con un dominio citoplásmico que puede unirse a los filamentos intermedios y puede unirse a actina también [34, 35, 36].

De SipB hasta el momento se conocen dos funciones, la primera es formando parte del translocón junto con SipC y la segunda es su capacidad de unirse a caspasa-1 e inducir piroptosis en macrófagos. [33, 37].

Proteína B de invasión de *Salmonella*, SipB.

SipB (*Salmonella* invasion protein B) es una proteína de 593 aminoácidos, con un peso molecular de 62, 411 Da. [33]. SipB está formada por un ectodominio citosólico N-terminal, una región central hidrofóbica con dos hélices transmembrana predichas y una región anfipática C-terminal [47].

Los efectores hidrofóbicos SipB y SipC forman un complejo extracelular después de ser secretados por el SST3 de la IPS1 y se cree que ensamblan una estructura integral plasmamembrana (translocón) que media la entrega de efectores.

Se sabe también que los residuos 3-8 de la proteína SipB constituyen una región esencial para la secreción de SipB desde la célula bacteriana y que la chaperona SipA, la cual es importante para estabilizar a SipB y SipC en el citosol bacteriano, se une a SipB en algún lugar entre los a.a. 80 y 100 de su dominio N-terminal [38].

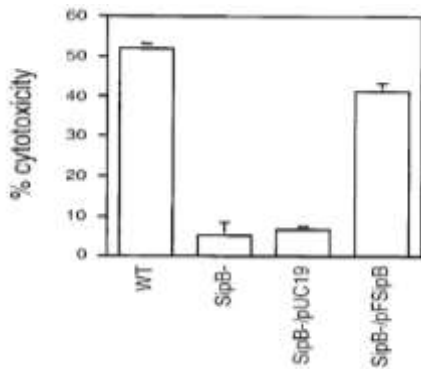
Las IPS tienen un papel central en el inicio del proceso de entrada en la célula hospedera. Las mutantes con deleciones individuales de SipB y SipC presentan deficiencias para invadir dado que no son capaces de translocar a los otros efectores en células Henle-407III (líneas celulares de epitelio intestinal) [33].

Originalmente se identificó a las proteínas SipB y SipC como homólogos de las invasinas de *Shigella* IpaB e IpaC. Se cree que además de IpaB e IpaC de *Shigella flexneri*, BipB y BipD de *Burkholderia pseudomallei*, YopB y YopD de *Yersinia enterocolitica*, EspB y EspD en *Escherichia coli* enteropatógena, BopB y BopD en *Bordetella bronchiseptica* y PopB y PopD en *Pseudomonas aeruginosa* son componentes homólogos del aparato de translocación formado por SipB y SipC en *Salmonella* [33, 38].

ANTECEDENTES.

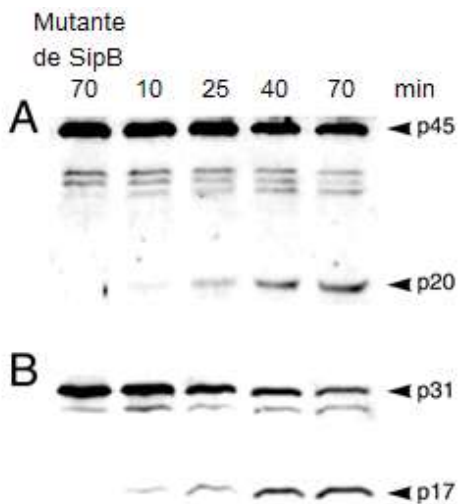
La muerte celular de macrófagos inducida por *Salmonella* depende de SipB.

A pesar de que los macrófagos son considerados como el primer blanco para la sobrevivencia de *Salmonella*, también se ha reportado que esta bacteria induce muerte celular en los macrófagos y células dendríticas. La infección de macrófagos con *Salmonella* estimula un programa de muerte celular del hospedero que depende únicamente de caspasa-1. La activación de la caspasa 1 en los macrófagos infectados por *Salmonella* resulta en la producción de las formas activas de IL-1 β e IL-18 y en la lisis rápida de las células con liberación del contenido intracelular pro inflamatorio [39]. Para describir a este proceso inherentemente inflamatorio dependiente de caspasa-1 se usa el término “piroptosis” del griego *pyro*, relacionado al fuego o fiebre, y *ptosis* (to-sis), que cae [40].



La capacidad citotóxica de *Salmonella* depende de SipB en la línea celular de macrófagos J774A.1. Las células fueron infectadas con una MOI de 100:1 por 10 horas y después fueron procesadas para un ensayo de liberación de LDH [37].

Caspasa-1 e IL-1B son activadas durante una infección de macrófagos con *Salmonella* [37].



Se activaron macrófagos murinos peritoneales y luego fueron infectados con *S. Typhimurium*. Después de los tiempos post-infección indicados, se corrieron los lisados celulares en un gel SDS/Page al 15% y luego se hizo inmunoblot con anti-caspasa-1 o anti IL-1B.

Como control, se infectaron macrófagos con la mutante de SipB ST100 por 70 min (línea 1 de cada gel) y fueron procesados en paralelo.

El linfocito B como blanco de *Salmonella*.

Salmonella invade y se multiplica en diferentes tipos celulares en el hospedero. Durante una infección las primeras células en ser infectadas por esta bacteria son las células epiteliales del intestino. Después de migrar a las células de la submucosa, la bacteria es captada por los macrófagos y células dendríticas, los cuales son considerados los principales acarreadores a los nódulos linfoides mesentéricos, el bazo y el hígado, dando como resultado la diseminación severa de la enfermedad [41]. Recientemente *Salmonella* fue detectada también en médula ósea y en timo, causando un timo reducido en tamaño y una baja en el número total de células tímicas [42].

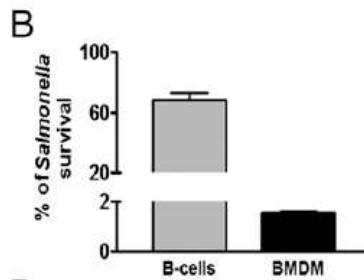
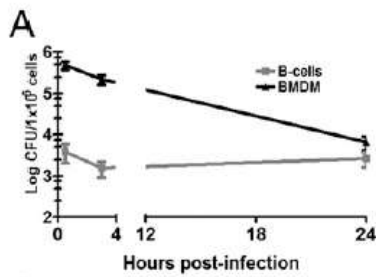
Salmonella también induce su entrada en las células B por medio de macropinocitosis, la formación de ruffling y de “spacious phagosomes”. La infección de las células B también requiere de las proteínas efectoras secretadas por el SST3 [41].

Las células B activadas migran a la médula ósea después de haber interactuado con las células T en los centros germinales y se diferencian en células plasmáticas productoras de anticuerpos.

Como se mencionó anteriormente, descubrimientos recientes indican que la médula ósea es infectada por *Salmonella* Typhi durante la fiebre tifoidea y en el 2009 Castro-Eguiluz, et al probaron que *S. Typhimurium* sobrevive en las células B, en los precursores de células B y en las poblaciones de células plasmáticas en la médula ósea, sugiriendo que este compartimento inmunológico puede ser un nicho para la infección in vivo con *Salmonella* [43].

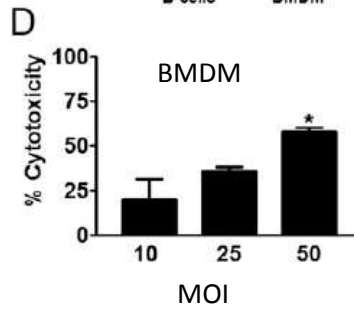
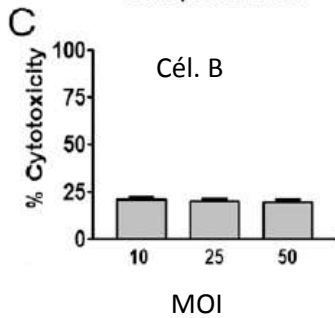
***Salmonella* no induce piroptosis en las células B.**

Salmonella puede infectar células B in vivo e in vitro, pero las células infectadas producen bajas cantidades de IL-1 β , además no hay citotoxicidad inducida por *Salmonella* y por tanto no se observa piroptosis de las células B infectadas [44].



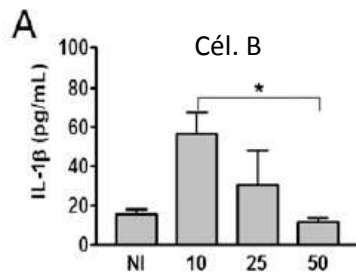
Los macrófagos controlan mejor la infección que las células B.

A y B) Se infectaron células B o BMDMs con Salmonella y a los tiempos indicados se lisaron las células y se sembraron en LB para determinar el no de CFUs.



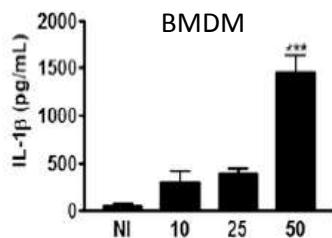
Porcentaje de sobrevivencia de salmonella= (CFUs 0 h PI/CFUs 24 h PI) x 100.

C y D) En comparación con los macrófagos, la muerte de células B no incrementa, independientemente de la MOI. El porcentaje de citotoxicidad fue determinado por la liberación de LDH a las 24 h PI.



Salmonella previene la secreción de IL-1β en células B.

Se estimularon células B o BMDMs con LPS por 24 hrs, luego se infectaron con la MOI indicada de Salmonella y a las 24 p.i. se midieron por ELISA los niveles de IL-1β en el sobrenadante.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.

Se ha demostrado que la proteína SipB de *Salmonella* Typhimurium participa en los eventos de invasión a las células eucariotas así como en la activación de caspasa-1 y la consecuente muerte de macrófagos, se desconoce la participación de SipB durante la infección de los linfocitos B por la bacteria.

HIPÓTESIS.

SipB participa en los procesos de ingreso y muerte de los linfocitos B infectados por *Salmonella* Typhimurium.

OBJETIVOS.

Objetivo general.

Definir el papel de la proteína SipB de *Salmonella* Typhimurium en la infección de los linfocitos B.

Objetivos particulares.

- 1) Analizar el papel de la proteína SipB de *Salmonella* Typhimurium en el ingreso al linfocito B.
- 2) Analizar el papel de la proteína SipB de *Salmonella* Typhimurium en la muerte del linfocito B.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Bacterias y condiciones de cultivo.

Se utilizó *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium) 14028 (ATCC) y *Salmonella* Typhimurium mutante $\Delta sipb$ (*Salmonella* $\Delta sipb$). Las bacterias se crecieron en caldo Luria Bertani (LB) durante toda la noche a 37 °C con agitación. *Salmonella* $\Delta sipb$ fue crecida en medio suplementado con cloranfenicol (30 µg/ml).

Los cultivos de toda la noche se diluyeron 1:50 en caldo LB fresco y se cultivaron en agitación a 37 °C hasta que alcanzaron la fase logarítmica que equivale a 1.2×10^9 bacterias/ml. Se utilizó una densidad óptica de 0.6 a 540 nm para ajustar la concentración bacteriana y la multiplicidad de infección (MOI) deseada.

Purificación de linfocitos B de bazo.

Los linfocitos B de bazo se obtuvieron a partir de ratones BALB/c hembras de seis a ocho semanas de edad (Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio, CINVESTAV). Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, se extrajo el bazo, se disgregó y se obtuvo una suspensión celular. Los linfocitos B fueron purificados mediante selección negativa con esferas MACS anti-CD43, anti-Ter119 y anti-CD4 (Milteny Biotec) y fueron resuspendidos en RPMI 1640 (in vitro) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (RP10) (Gibco).

Obtención de macrófagos derivados de médula ósea (MDMO).

Se extrajo médula ósea del fémur de ratones BALB/c hembras de 6 a 8 semanas de edad. Las células obtenidas fueron colocadas en placas de cultivo de seis pozos (Biofil) para su diferenciación a macrófagos durante 8 días en medio RPMI 1640 (in vitro) suplementado con 10% de SFB (RP10) (Gibco), 30% de sobrenadante obtenido del cultivo de células L929 y 1% de antibiótico/antimicótico (in vitro) a 37°C y 5% de CO₂.

Ensayos de infección y sobrevivencia *in vitro*.

a) Linfocitos B

2×10^6 linfocitos B se colocaron en 700 μ l de medio RPMI 1640 (*in vitro*) suplementado con 10% de SFB (RP10) (Gibco) en tubos Eppendorf y se infectaron con *Salmonella* a las MOI indicadas en cada experimento (10, 25 o 50). Después de 30 minutos de contacto célula-bacteria las células fueron lavadas dos veces con PBS-gentamicina (80 μ g/ml) (Sigma Aldrich) para eliminar los remanentes de bacteria extracelular y el cultivo se continuó en 1ml de medio RPMI 1640 (*in vitro*) fresco suplementado con gentamicina (80 μ g/ml) a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Para los ensayos de sobrevivencia bacteriana se trató a los linfocitos B infectados con 200 μ l de PBS-Tritón X-100 al 2% (Sigma Aldrich) y el lisado celular se sembró en cajas LB agar (Invitrogen) que se incubaron durante 24 horas a 37 °C para recuperar las UFCs 1, 3 y 24 horas post-infección. El porcentaje de sobrevivencia se calculó usando la fórmula: UFCs a 24h/UFCs a 1 h x 100 y el índice de invasión usando la fórmula: UFCs $\Delta sipb$ 1h/UFCs WT 1h.

b) Macrófagos derivados de médula ósea.

Los MDMO se despegaron de las placas de cultivo con PBS a 4°C y se colocó una cantidad de 3×10^5 en medio RPMI 1640 (*in vitro*) suplementado con 10% de SFB (RP10) (Gibco) y 1% de antibiótico-antimicótico (volumen final de 1ml) en placas de 24 pozos. 24 horas después se reemplazó el medio con 500 μ l de medio libre de antibióticos (una hora antes de la infección bacteriana). Posteriormente se adicionaron 500 μ l de medio de cultivo conteniendo la MOI deseada (10, 25 o 50) y se centrifugó a 1400 r.p.m. durante 1 minuto para sincronizar la infección. Se incubó la placa a 37°C y 5% de CO₂ por 30 min. Posteriormente la bacteria extracelular fue eliminada lavando 3 veces las células con PBS y al final se agregó 1 ml de medio RPMI suplementado con 100 μ g/ml de gentamicina y se continuó con la incubación por 1, 3 o 24 horas post-infección. Para los ensayos de sobrevivencia bacteriana se retiraron las placas de la incubadora, se removieron los sobrenadantes y se trató a los macrófagos infectados con 200 μ l de PBS-Tritón X-100 al 2% (Sigma Aldrich) y el lisado celular se sembró en cajas LB agar (Invitrogen) que se incubaron durante 24 horas a 37 °C para recuperar las UFCs 1, 3 y 24 horas post-infección. El porcentaje de sobrevivencia se calculó usando la fórmula: UFCs a 24h/UFCs a 1 h x 100 y el índice de invasión usando la fórmula: UFCs $\Delta sipb$ 1h/UFCs WT 1h.

Detección de Caspasa-1.

Los lisados de los linfocitos B infectados con S. WT o S. Δ sipb, se corrieron en geles de garosa al 15% y posteriormente fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa. La presencia de pro-caspasa-1 (45 kDa) y de caspasa-1 (20 kDa) se detectó por Western blot.

Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism versión 7.0 (GraphPad Software). Los datos representan la media \pm SD y fueron analizados usando la prueba *t* de Student. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

RESULTADOS.

La proteína SipB de *Salmonella* Typhimurium participa en la invasión eficiente de linfocitos B.

Con la finalidad de estudiar la participación de SipB durante la invasión de linfocitos B se generó la cepa mutante de *Salmonella* Typhimurium $\Delta sipb$, lo que nos permitió analizar la capacidad de la mutante para infectar al linfocito B.

3×10^5 linfocitos B fueron infectados con las cepas de *Salmonella* WT y *Salmonella* $\Delta sipb$ a una MOI de 10, 25 o 50. Como control se infectó el mismo número de MDMO. La cantidad de UFCs de *Salmonella* recuperadas una hora post-infección, nos permitió calcular el índice de invasión: UFCs S. $\Delta sipb$ 1 hora post-infección/ UFCs S. WT 1 hora post-infección.

En la figura 4 se observa que a una MOI de 10 la capacidad de invasión de *Salmonella* en los linfocitos B disminuye un 0.47 en ausencia de SipB. A una MOI de 25 la disminución es de 0.46 y a una MOI de 50 disminuye un 0.51. Por el contrario, en el caso de los MDMO, la variación es mínima, mostrando que la cepa mutante invade en la misma proporción que la cepa WT

En conjunto, los datos muestran que SipB se requiere para invadir eficientemente al linfocito B.

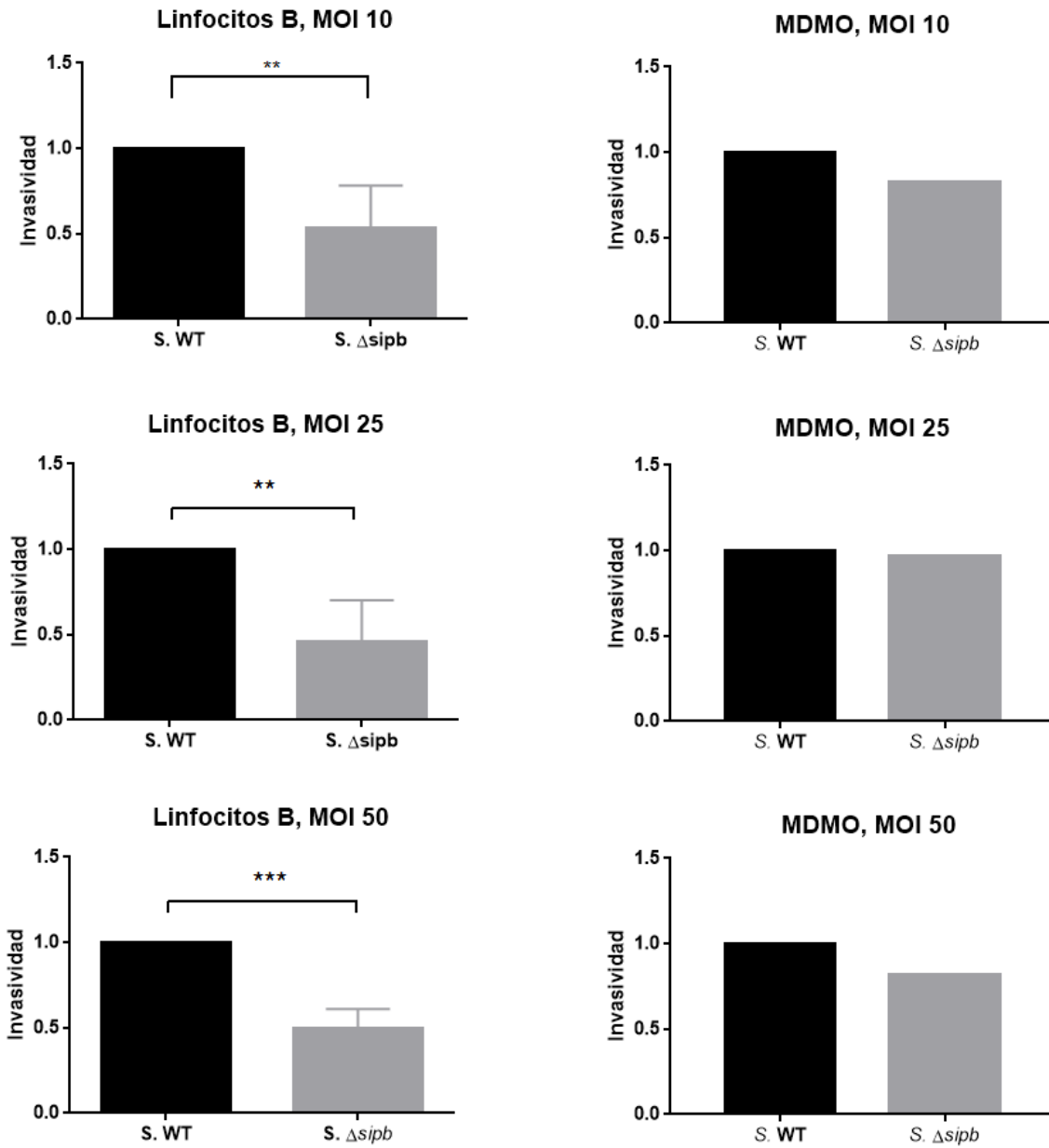


Figura 4. La ausencia de SipB altera la capacidad invasora de *Salmonella*. 3×10^5 linfocitos B y 3×10^5 MDMO fueron infectados con las cepas de S. WT y S. $\Delta sipB$ a las MOI de 10, 25 y 50. Se obtuvieron las UFCs 1 hora post-infección. El índice de invasión se calculó usando la fórmula: Índice de invasión = UFCs S. $\Delta sipB$ 1h post-infección / UFCs S. WT 1 hora post-infección.

SipB no altera la capacidad de *Salmonella* de sobrevivir en linfocitos B.

Para evaluar si la proteína SipB desempeña un papel en la capacidad de *Salmonella* de sobrevivir dentro del linfocito B, 3×10^5 linfocitos B fueron infectados con las cepas de *Salmonella* WT y *Salmonella* $\Delta sipb$ a una MOI de 10, 25 y 50. Como control se infectó el mismo número de MDMO.

Como se observa en la figura 5, al analizar la entrada y permanencia bacteriana dentro del linfocito B encontramos que el número de colonias de *S. $\Delta sipb$* recuperadas 1 hora, 3 horas y 24 horas post-infección es menor al número de colonias recuperadas de *S. WT*.

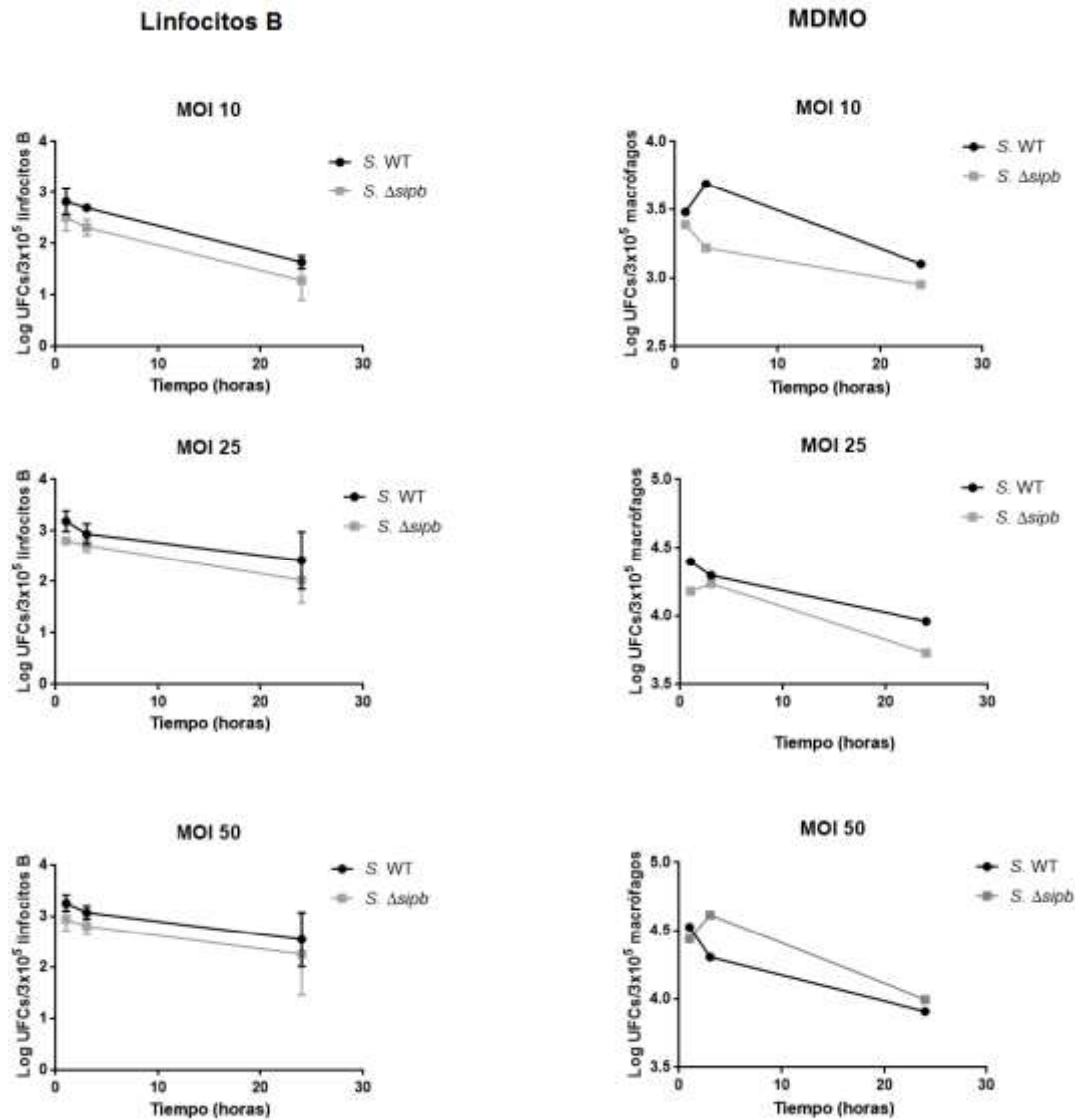


Figura 5. La ausencia de SipB afecta el número de UFCs recuperadas de linfocitos B a diferentes horas post-infección. 3×10^5 linfocitos B y 3×10^5 MDMO fueron infectados con las cepas de *S. WT* y *S. $\Delta sipb$* a las MOI de 10, 25 y 50. Se obtuvieron las UFCs 1 hora, 3 horas y 24 horas post-infección.

Sin embargo, al calcular el índice de sobrevivida a las diferentes MOI, tenemos que en el linfocito B no hay una diferencia significativa entre las dos cepas, como se observa en la figura 6.

En el caso de los MDMO encontramos que el porcentaje de sobrevivida de *S. Δsipb* es mayor comparado con el de la *S. WT*. A una MOI de 10 la diferencia es del 14.27 %, a una MOI de 25 la diferencia es del 7.10% y con una MOI de 50 la diferencia es del 5.52%.

Los datos sugieren que una vez que *Salmonella* se encuentra dentro de la VCS en el linfocito B, no hay participación de SipB en la sobrevivida bacteriana, mientras que cuando la bacteria se encuentra en la VCS dentro del macrófago, la presencia de la proteína sugiere que está participando en alguno de los mecanismos que controlan la multiplicación de la bacteria.

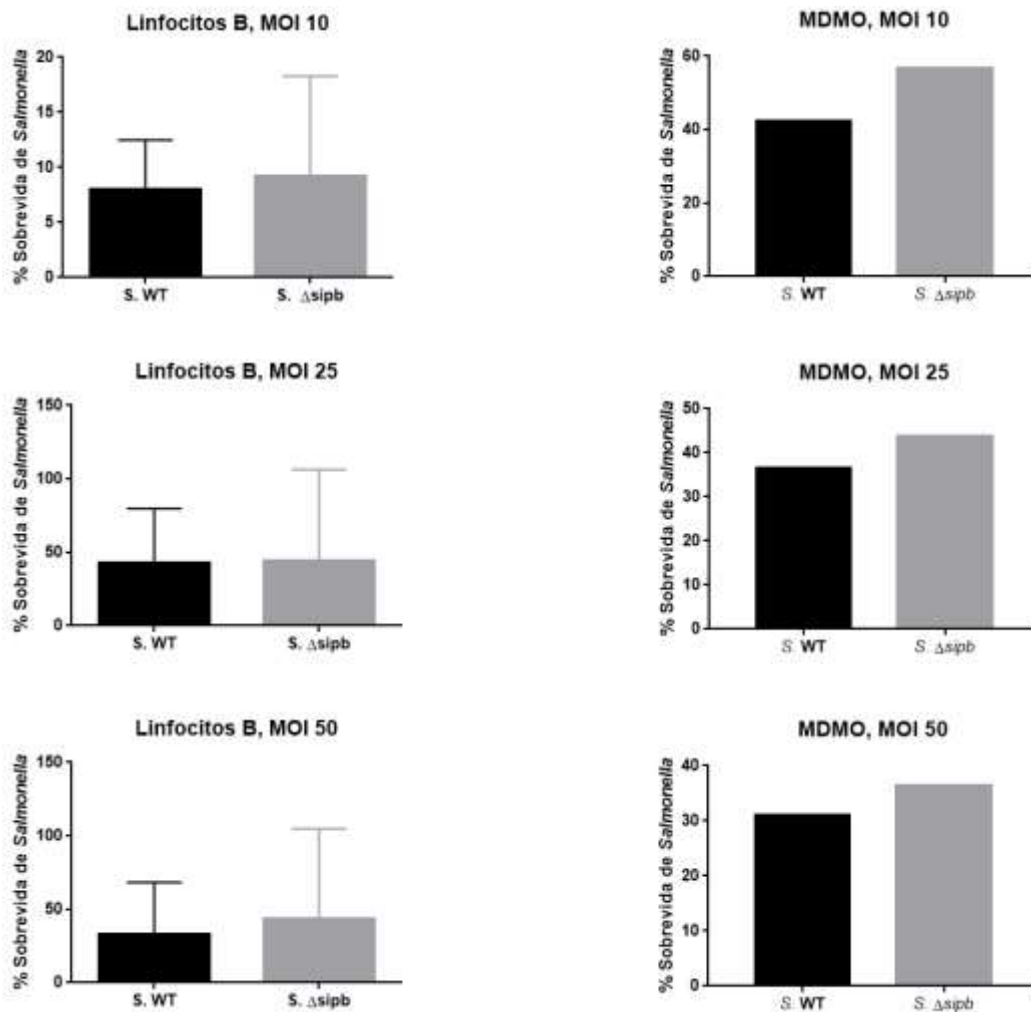


Figura 6. SipB no altera la capacidad de *Salmonella* de sobrevivir en linfocitos B. 3×10^5 linfocitos B y 3×10^5 MDMO fueron infectados con las cepas de *S. WT* y *S. Δsipb* a las MOI indicadas. Se obtuvieron las UFCs 1 hora, 3 horas y 24 horas post-infección. El índice de sobrevivida se obtuvo usando la fórmula: % de sobrevivida = UFCs a 24h post-infección/ UFCs a 1 hora post-infección x 100.

Caspasa-1 no es activada por la proteína SipB de *Salmonella* en linfocitos B infectados.

Anteriormente se demostró que la proteína SipB de *Salmonella* se asocia con la proteasa proapoptótica caspasa-1 activándola y esto a su vez lleva a la muerte por piroptosis en macrófagos (Hersh, *et al*; 1999).

Para determinar si la presencia de SipB durante una infección con *Salmonella* en linfocitos B, da lugar al procesamiento catalítico del precursor de 45 kDa de caspasa-1 para formar las subunidades maduras de la enzima de 20 y 10 kDa, los lisados de linfocitos B infectados con *Salmonella* fueron analizados por western blot con un anticuerpo anti-caspasa-1. A los 30 y 60 minutos post-infección se detectaron dos bandas, una de 45 kDa que corresponde al precursor de caspasa-1 y otra banda de aproximadamente 40 kDa representando una forma de procesamiento intermedio pero no se detectaron las bandas de 20 kDa o 10 kDa correspondientes a la forma activa de caspasa-1 tanto en la infección con *S. WT* como en la infección con *S. Δsipb* como se observa en la figura 7.

Este resultado nos permite concluir que caspasa-1 no está siendo activada por SipB en los linfocitos B.

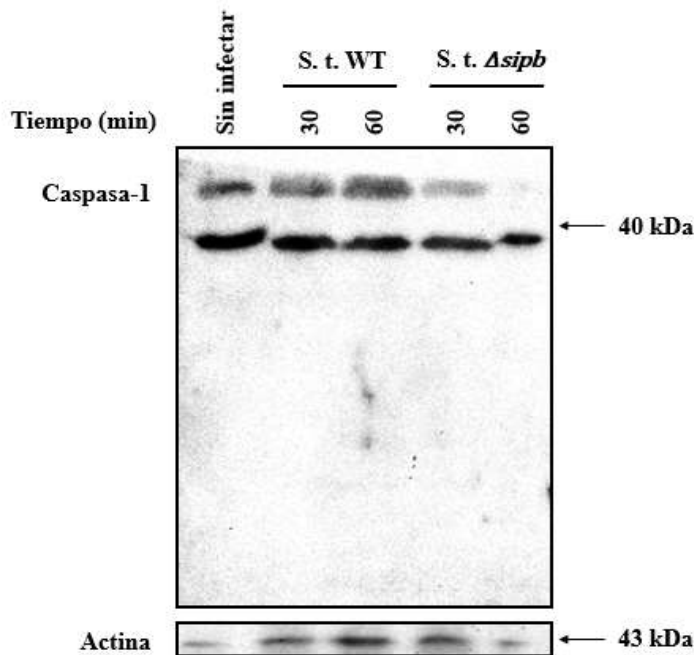


Figura 7. Caspasa-1 no es activada por la proteína SipB de *Salmonella* en linfocitos B infectados.

La citotoxicidad inducida por *Salmonella* en linfocitos B es independiente de SipB.

Se sabe que *Salmonella* es capaz de causar piroptosis en macrófagos y que la ausencia de SipB reduce la toxicidad a niveles mínimos (Hersh, *et al*; 1999).

Para determinar si SipB puede inducir citotoxicidad en linfocitos B, medimos la liberación de la enzima citoplasmática LDH 24 horas post-infección con las cepas de *S. WT* y *S. Δsipb*.

Calculamos el porcentaje de citotoxicidad mediante la fórmula:

$$CTX = \frac{Abs(muestra) - Abs(espontánea)}{Abs(total) - Abs(espontánea)} \times 100$$

Nuestros resultados muestran un porcentaje de muerte similar, en los linfocitos B que fueron infectados con la cepa WT o con la mutante. De este modo concluimos que la proteína SipB no participa en la apoptosis del linfocito B. Ver figura 8.

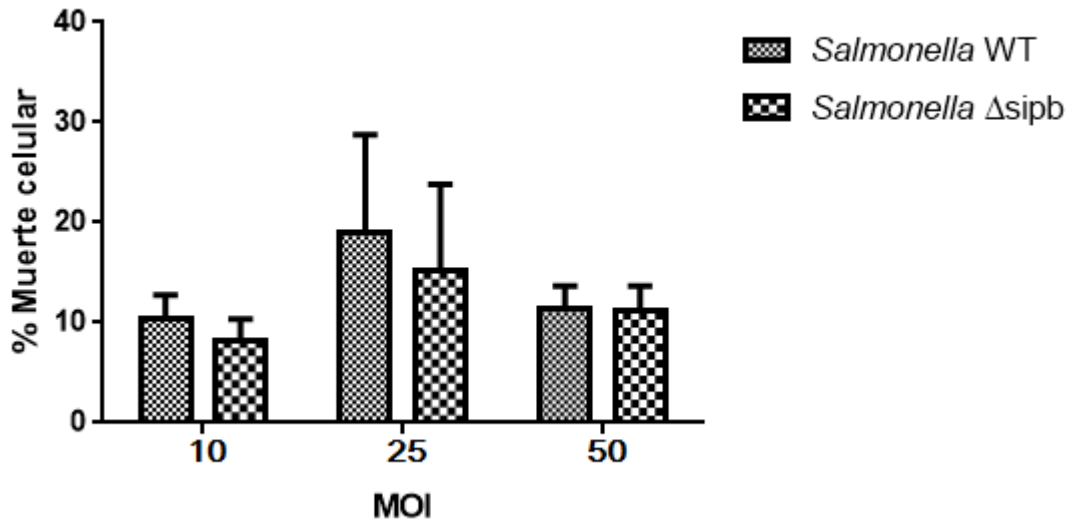


Figura 8. Sipb no tiene un papel en la inducción de muerte celular en linfocitos B.

DISCUSION.

Salmonella invade y se multiplica en diferentes tipos celulares del hospedero. Entre ellos, los macrófagos y células dendríticas son considerados como principales blancos de la infección. La habilidad de la bacteria para sobrevivir y replicarse dentro de estas células constituye un factor patogénico relevante en el desarrollo y diseminación de la enfermedad [48].

También se ha demostrado que *Salmonella* es capaz de infectar e incluso sobrevivir por periodos prolongados en linfocitos B y que estos se encuentran involucrados en la diseminación bacteriana durante la patogénesis de la infección [49]. Sin embargo, aún no se determinan con exactitud los elementos bacterianos responsables de la modulación de los procesos que favorecen la prevalencia de *Salmonella* dentro del linfocito B.

Se ha demostrado que *Salmonella* requiere del SST3 codificado en la IPS1 para invadir eficientemente células no fagocíticas. Este sistema es una estructura compleja formada por varias subunidades, las que a su vez están integradas por diversas proteínas, entre las cuales se encuentra la proteína SipB.

Sabemos que SipB, junto con la proteína SipC, forma parte del translocón del llamado complejo de aguja. Esta estructura forma un poro en la membrana de la célula hospedera por el cual se translocan las proteínas efectoras al citoplasma hospedero [50].

En este trabajo observamos que en ausencia de SipB, la invasividad de *Salmonella* Typhimurium en el linfocito B se ve reducida en porcentajes cercanos al 50%. Lo cual nos indica que SipB desempeña un papel importante en la inducción de entrada de *Salmonella* en el linfocito B, sin embargo probablemente existan otras proteínas que también participan en la invasión.

Ya que el extremo N-terminal de SipB es el que interactúa con el complejo de punta formado por SipB [47], parece poco probable que en el caso de la mutante de SipB se esté formando un sistema de secreción estable, que permita la translocación de los efectores.

Por otro lado, aunque es bien sabido que el SST3-1 es el principal factor de invasión de *Salmonella* en estudios *in vitro*, su contribución a la patogénesis podría depender del modelo utilizado [51]. Estudios recientes demuestran que los diferentes serotipos de *Salmonella* que carecen del SST3-1 todavía tienen la capacidad de invadir las células *in vitro* de diversos orígenes y pueden ser patógenos en diferentes modelos de infección *in vivo* [52, 53]. Además, se demostró que no se requiere la SST3-1 para la internalización *Salmonella* en un epitelio intestinal de 3 dimensiones [54].

Tomados en conjunto, estos resultados indican que mecanismos de invasión independientes del SST3-1 también desempeñan un papel importante en la infección y patogénesis de *Salmonella*.

Se sabe que algunas bacterias intracelulares han evolucionado y tienen dos estrategias diferentes para invadir las células no fagocíticas mediante la modulación del citoesqueleto de actina: "Zipper" y los mecanismos de activación "Trigger". Recientes investigaciones han demostrado que *Salmonella* puede invadir las células no fagocíticas por un mecanismo de "Zipper" a través de la invasina Rck, una proteína codificada por el gen *rck* situado en un gran plásmido de virulencia [53].

La invasina Rck se une a receptores de la membrana de la célula invadida, dichos receptores celulares no han sido identificados aún, pero como se observa para el mecanismo de activación, la entrada mediada por Rck involucra proteínas de la célula huésped similares a las Rho GTPasas Rac1 y Cdc42, que conducen a la activación del complejo Arp2/3 y la movilización y reordenamientos de la actina, conduciendo a la absorción de bacteria [53, 55, 56].

El papel de Rck en la invasión de *Salmonella* ha sido claramente demostrado y se encontró que depende de las líneas y tipos celulares [53].

Además de Rck y del SST3-1, PagN otra invasina, también ha sido ampliamente identificada en el género *Salmonella*. Se ha demostrado que la unión de PagN a proteoglicanos de sulfato de heparina extracelular induce invasión por *Salmonella*. El proceso de entrada mediado por esta proteína de la membrana externa requiere de la polimerización de actina, sin embargo, aún se desconoce el mecanismo exacto [57].

Esto no lleva a pensar que en la importancia del mecanismo de “Trigger”, como un mecanismo secundario de invasividad que podría estarse llevando a cabo en las células B.

En lo que respecta a la piroptosis inducida por SipB, nuestros resultados muestran que no hay activación de Caspasa-1 en el linfocito B y que el porcentaje de muerte celular del linfocito B no se ve afectado con la presencia de SipB.

Cuando Caspasa-1 es activada, promueve a su vez la activación y secreción de las citocinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18. Además, Caspasa-1 activada induce una forma de muerte celular proinflamatoria en macrófagos llamada piroptosis.

En macrófagos se conocen dos mecanismos de activación de Caspasa-1. En el primero, los inflamomas que contienen la proteína adaptadora Asc forman conglomerados en el que Caspasa-1 realiza autoproteólisis y forma las subunidades p20 y p10. Esta Caspasa-1 totalmente procesada es capaz de causar muerte celular y promover un procesamiento eficiente de IL-1 β /IL-18.

En el segundo mecanismo, se forma un llamado “complejo de muerte” en ausencia de Asc, en el que no se realiza la autoproteólisis de Caspasa-1, sin embargo, el complejo activa a Caspasa-1 lo suficiente para promover la muerte celular pero con un procesamiento ineficiente de IL-1 β /IL-18 [58].

A diferencia de lo que ocurre en macrófagos, durante este trabajo no observamos ninguno de estos mecanismos en los linfocitos B, puesto que por un lado en el Western blot no aparecen las subunidades p20 ni p10 de Caspasa-1 y por el otro, en datos descritos por Pérez-López en el 2013 se observó que la producción de IL-1 β no aumenta al incrementar la MOI de *Salmonella* con que se infecta al linfocito B.

Lo anterior nos permite concluir que el linfocito B no hay activación alguna de Casapasa-1 y tampoco hay piroptosis inducida por SipB.

CONCLUSIONES.

- SipB participa en la invasión eficiente del linfocito B.
- SipB no altera la capacidad de Salmonella Typhimurium de sobrevivir dentro del linfocito B.
- Caspasa-1 no es activada por SipB dentro del linfocito B infectado.
- El porcentaje de muerte del linfocito B es independiente de SipB.

PERSPECTIVAS.

- Evaluar el papel de SipB en la invasión del linfocito B en un modelo *in vivo*.
- Evaluar otras posibles formas en que *Salmonella* invade al linfocito B.

REFERENCIAS

1. Pegues, D. A., Ohi, M. E. & Miller, S. I. in Principles and Practice of Infectious Diseases (eds Mandell, G. L., Bennet, J. E. & Dolin, R.) 2636–2654 (Churchill Livingstone, New York, 2005).
2. Rhen Mikael. Salmonella: Molecular Biology and Pathogenesis. 1-4 (Wymondham Horizon Bioscience 2007).
3. Bakken, K., and T.M. Vogelsang. The pathogenesis of Salmonella typhimurium infection in mice. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.* 27:41–50. (1950).
4. Harris, J. C., Dupont, H. L. & Hornick, R. B. Fecal leukocytes in diarrheal illness. *Ann. Intern. Med.* 76, 697–703 (1972).
5. Foster JW, Hall HK. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of Salmonella typhimurium. *J. Bacteriol.* 173:5129–5135. (1991).
6. Jones, B. D., Ghorri, N. & Falkow, S. Salmonella typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J. Exp. Med.* 180, 15–23 (1994).
7. Francis, C. L., Starnbach, M. N. & Falkow, S. Morphological and cytoskeletal changes in epithelial cells occur immediately upon interaction with Salmonella typhimurium grown under low-oxygen conditions. *Mol. Microbiol.* 6, 3077–3087 (1992).
8. Takeuchi, A. Electron microscope studies of experimental Salmonella infection. I. Penetration into the intestinal epithelium by Salmonella typhimurium. *Am. J. Pathol.* 50, 109–136 (1967).
9. Baumler, A. J., Tsolis, R. M. & Heffron, F. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by Salmonella typhimurium. *Infect. Immun.* 64, 1862–1865 (1996).
10. Hardt, W. D., Chen, L. M., Schuebel, K. E., Bustelo, X. R. & Galan, J. E. S. typhimurium encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* 93, 815–826 (1998).
11. Bakshi, C. S. et al. Identification of SopE2, a Salmonella secreted protein which is highly homologous to SopE and involved in bacterial invasion of epithelial cells. *J. Bacteriol.* 182, 2341–2344 (2000).
12. Patel, J. C. & Galan, J. E. Differential activation and function of Rho GTPases during Salmonella-host cell interactions. *J. Cell Biol.* 175, 453–463 (2006).
13. Cheminay C, Chakravorty D, Hensel M. Role of neutrophils in murine salmonellosis. *Infect. Immun.* 72:468–477. (2004).
14. Johansson C, Ingman M, Wick MJ. Elevated neutrophil, macrophage and dendritic cell numbers characterize immune cell populations in mice chronically infected with Salmonella. *Microb. Pathog.* 41:49 –58. (2006).
15. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327:656–661. (2010).

16. Garcia-del Portillo F, Finlay BB. Targeting of Salmonella typhimurium to vesicles containing lysosomal membrane glycoproteins bypasses compartments with mannose 6-phosphate receptors. *J. Cell Biol.* 129:81–97. (1995).
17. Rathman M, Barker LP, Falkow S. The unique trafficking pattern of Salmonella typhimurium-containing phagosomes in murine macrophages is independent of the mechanism of bacterial entry. *Infect. Immun.* 65:1475–1485. (1997).
18. Meresse S, Unsworth KE, Habermann A, Griffiths G, Fang F, Martinez- Lorenzo MJ, Waterman SR, Gorvel JP, Holden DW. Remodelling of the actin cytoskeleton is essential for replication of intravacuolar Salmonella. *Cell. Microbiol.* 3:567–577. (2001).
19. Deiwick J, Salcedo SP, Boucrot E, Gilliland SM, Henry T, Petermann N, Waterman SR, Gorvel JP, Holden DW, Meresse S. The translocated Salmonella effector proteins SseF and SseG interact and are required to establish an intracellular replication niche. *Infect. Immun.* 74:6965– 6972. (2006).
20. Salcedo SP, Holden DW. SseG, a virulence protein that targets Salmonella to the Golgi network. *EMBO J.* 22:5003–5014. (2003).
21. Alpuche-Aranda CM, Racoosin EL, Swanson JA, Miller SI. Salmonella stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J. Exp. Med.* 179:601– 608. (1994).
22. Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB. Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect.* 2:145–156. (2000).
23. Marcus, S. L., Brumell, J. H., Pfeifer, C. G., & Finlay, B. B. Salmonella pathogenicity islands: Big virulence in small packages. *Microbes and Infection*, 2(2), 145–156. doi:10.1016/S1286-4579(00)00273-2. (2000).
24. Fàbrega, A., & Vila, J. Salmonella enterica serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical microbiology reviews*, 26(2), 308–41. doi:10.1128/CMR.00066-12. (2013).
25. Bliska, J. B., J. E. Galán, and S. Falkow. Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. *Cell* 73:903–920. (1993).
26. Hansen-Wester, I. & Hensel, M. Salmonella pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect.* 3, 549–559 (2001).
27. Kubori, T. et al. Supramolecular structure of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system. *Science* 280, 602–605 (1998).
28. Kimbrough, T. G. & Miller, S. I. Contribution of Salmonella typhimurium type III secretion components to needle complex formation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 11008–11013 (2000).
29. Haraga, A., Ohlson, M. B., & Miller, S. I. Salmonellae interplay with host cells. *Nature Reviews Microbiology*, 6(1), 53–66. doi:10.1038/nrmicro1788 (2008).
30. Kimbrough, T. G. & Miller, S. I. Assembly of the type III secretion needle complex of Salmonella typhimurium. *Microbes Infect.* 4, 75–82 (2002).
31. Miao, E. A. & Miller, S. I. A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by Salmonella typhimurium. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 7539–7544 (2000).

32. Lee, S. H. & Galan, J. E. Salmonella type III secretion associated chaperones confer secretion-pathway specificity. *Mol. Microbiol.* 51, 483–495 (2004).
33. Kaniga, K., Tucker, S., Trollinger, D., & Galan, J. E. Homologs of the *Shigella* IpaB and IpaC invasins are required for *Salmonella typhimurium* entry into cultured epithelial cells. *Journal of Bacteriology*, 177(14), 3965–3971. (1995).
34. Hayward, R. D. & Koronakis, V. Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive *Salmonella*. *EMBO J.* 18, 4926–4934 (1999).
35. Zhou, D., Mooseker, M. S. & Galan, J. E. Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science* 283, 2092–2095 (1999).
36. Scherer, C. A., Cooper, E. & Miller, S. I. The *Salmonella* type III secretion translocón protein SspC is inserted into the epithelial cell plasma membrane upon infection. *Mol. Microbiol.* 37, 1133–1145 (2000).
37. Hersh, D., Monack, D. M., Smith, M. R., Ghorri, N., Falkow, S., & Zychlinsky, A. The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(5), 2396–401. doi:10.1073/pnas.96.5.2396. (1999).
38. Kim, B. H., Kim, H. G., Kim, J. S., Jang, J. I., & Park, Y. K. Analysis of functional domains present in the N-terminus of the SipB protein. *Microbiology*, 153(9), 2998–3008. doi:10.1099/mic.0.2007/007872-0. (2007).
39. Fink, S. L., & Cookson, B. T. Pyroptosis and host cell death responses during *Salmonella* infection. *Cellular Microbiology*, 9(11), 2562–2570. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01036.x. (2007).
40. Cookson, B. T., & Brennan, M. a. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol.* 9(3), 113–114. doi:10.1016/S0966-842X(00)01936-3.(2001).
41. Rosales-Reyes, R., Pérez-López, A., Sánchez-Gómez, C., Hernández-Mote, R. R., Castro-Eguiluz, D., Ortiz-Navarrete, V., & Alpuche-Aranda, C. M. *Salmonella* infects B cells by macropinocytosis and formation of spacious phagosomes but does not induce pyroptosis in favor of its survival. *Microbial Pathogenesis*, 52(6), 367–374. doi:10.1016/j.micpath.2012.03.007. (2012).
42. Leyva-Rangel, J. P., de los Angeles Hernández-Cueto, M., Galan-Enriquez, C.-S., López-Medina, M., & Ortiz-Navarrete, V. Bacterial clearance reverses a skewed T-cell repertoire induced by *Salmonella* infection. *Immunity, Inflammation and Disease*, 3, 209–223. doi:10.1002/iid3.60. (2015).
43. Castro-Eguiluz, D., Pelayo, R., Rosales-García, V., Rosales-Reyes, R., Alpuche-Aranda, C., & Ortiz-Navarrete, V. B cell precursors are targets for *Salmonella* infection. *Microbial Pathogenesis*, 47(1), 52–56. doi:10.1016/j.micpath.2009. 04.005. (2009).
44. Perez-Lopez, A., Rosales-Reyes, R., Alpuche-Aranda, C., Ortiz-Navarrete, V. *Salmonella* Downregulates Nod-like Receptor Family CARD Domain Containing Protein 4 Expression To Promote Its Survival in B Cells by Preventing inflammasome Activation and Cell Death. *The Journal of Immunology*, 2013, 190: 1201–1209. (2013).
45. Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Ricciardi-Castagnoli, P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate

- gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunology*, 2(4), 361–367. doi:10.1038/86373. (2001).
46. S. Chatterjee, S. Chaudhury, A. C. McShan, K. Kaur, R. N. De Guzman. Structure and Biophysics of Type III Secretion in Bacteria *Biochemistry*. 52, 2508–2517. (2013).
 47. Kaur, K., Chatterjee, S., & De Guzman, R. N. Characterization of the Shigella and Salmonella Type III Secretion System Tip-Translocon Protein-Protein Interaction by Paramagnetic Relaxation Enhancement. *ChemBioChem*, 17(8), 745–752. <http://doi.org/10.1002/cbic.201500556>. (2016).
 48. Mastroeni P1, Sheppard M. Salmonella infections in the mouse model: host resistance factors and in vivo dynamics of bacterial spread and distribution in the tissues. *Microbes Infect.* Apr;6(4):398-405. (2004).
 49. Rosales-reyes, R., Alpuche-aranda, C., Ramı, L., Castro-eguiluz, A. D., & Ortiz-navarrete, V. Survival of Salmonella enterica Serovar Typhimurium within Late Endosomal-Lysosomal Compartments of B Lymphocytes Is Associated with the Inability To Use the Vacuolar Alternative Major Histocompatibility Complex Class I Antigen-Processing Pathway, 73(7), 3937–3944. <http://doi.org/10.1128/IAI.73.7.3937>. (2005).
 50. Lara-Tejero, M., & Galán, J. E. Salmonella enterica serovar Typhimurium pathogenicity island 1-encoded type III secretion system translocases mediate intimate attachment to nonphagocytic cells. *Infection and Immunity*, 77(7), 2635–2642. <http://doi.org/10.1128/IAI.00077-09>. (2009).
 51. Wallis, T. S., & Galyov, E. E. Molecular basis of Salmonella -induced enteritis. *Molecular Microbiology*, 36(5), 997–1005. (2000).
 52. Aiaştu, A., Pucciarelli, M. G., & García-Del Portillo, F. Salmonella enterica serovar typhimurium invades fibroblasts by multiple routes differing from the entry into epithelial cells. *Infection and Immunity*, 78(6), 2700–2713. <http://doi.org/10.1128/IAI.01389-09>. (2010).
 53. Rosselin, M., Abed, N., Virlogeux-Payant, I., Bottreau, E., Sizaret, P. Y., Velge, P., & Wiedemann, A. Heterogeneity of type III secretion system (T3SS)-1-independent entry mechanisms used by Salmonella Enteritidis to invade different cell types. *Microbiology*, 157(3), 839–847. <http://doi.org/10.1099/mic.0.044941-0>. (2011).
 54. Radtke, A. L., Wilson, J. W., Sarker, S., & Nickerson, C. A. Analysis of interactions of salmonella type three secretion mutants with 3-D intestinal epithelial cells. *PLoS ONE*, 5(12). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0015750>. (2010).
 55. Unsworth, K. E., Way, M., Mcniven, M., Machesky, L., & Holden, D. W. Analysis of the mechanisms of Salmonella -induced actin assembly during invasion of host cells and intracellular replication, 6, 1041–1055. <http://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00417.x>. (2004).
 56. Mijouin, L., Rosselin, M., Bottreau, E., Pizarro-cerda, J., Cossart, P., & Velge, P. Salmonella enteritidis Rck-mediated invasion requires activation of Rac1 , which is dependent on the class I PI 3-kinases-Akt signaling pathway, 26(4), 1569–1581. <http://doi.org/10.1096/fj.11-189647>. (2016).

57. Lambert, M. A., & Smith, S. G. J. The PagN protein of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is an adhesin and invasin, 11, 1–11. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-8-142>. (2008).
58. Broz, P., von Moltke, J., Jones, J.W., Vance, R.E., Monack, D.M. Differential requirement for Caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell Host Microbe*. doi: 10.1016/j.chom.2010.11.007. (2010).