



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE
BIOMEDICINA MOLECULAR**

**“Análisis de la vía de señalización Akt-Yap en linfocitos B
infectados con *Salmonella typhimurium*.”**

T E S I S

Que presenta

M. en C. ABRAHAM GARCÍA GIL

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOMEDICINA MOLECULAR**

**Director de Tesis:
Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete**

Ciudad de México.

DICIEMBRE, 2017

El autor de este trabajo está adscrito al Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional y fue apoyado con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología durante la realización del mismo, con el número de CVU 419968 y con el número de becario 261874.

Agradecimientos

A mi esposa, quien ha caminado conmigo de la mano desde que éramos adolescentes, no sabíamos que nos deparaba la vida, pero sabíamos que estando juntos lo demás no importaba. Gracias Kitzia, nada de esto tendría sentido sin ti.

Al señor Patricio García Barraza, el hombre con mayor fuerza de voluntad que he conocido, mi mejor amigo y mi padre. Un hombre que hizo lo imposible para que sus hijos tuvieran una educación. Gracias por tu esfuerzo.

A la señora Guadalupe Gil Panduro mi madre, por soportar junto conmigo la distancia sabiendo que es por el bien de la familia. Los amo.

A mis hermanos Cindy y Rey por regalarme unos sobrinos tan hermosos y estar ahí para recordarme de dónde vengo.

Al Dr. Vianney quien tomo la responsabilidad de formarme dentro del mundo de la ciencia, mi infinito agradecimiento hacia usted.

A las personas que me apoyaron desde el primer día que llegue al laboratorio, Elsy, Noni, Chuchin, Julio e importantemente mi amigo, mi hermano, gracias Benji.

A mis estudiantes, Carlos Samuel, Luis Uriel un honor trabajar con ustedes, aprendí mas de ustedes de lo que yo les pude enseñar.

ÍNDICE

Índice de figuras	7
Abreviaturas	8
Resumen	11
Abstract	12
Introducción	13
<i>Salmonella</i>	13
Invasión y diseminación de <i>Salmonella</i>	14
Factores de virulencia de <i>Salmonella</i>	15
Respuesta inmune innata contra <i>Salmonella</i>	16
Akt	17
Los linfocitos B	18
Antecedentes directos	19
Justificación	22
Hipótesis	23
Objetivos	24
Objetivo general	24
Objetivos particulares	24
Materiales y métodos	25
Cepas de ratón	25
Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	25

Obtención de células primarias	25
Ensayos de infección, invasión y sobrevida	25
Plasmidos	26
Determinación de citocinas	26
Ensayo de citotoxicidad	26
Western Blot	26
Inmunofluorescencia	27
Transfección	27
Análisis estadístico	28
Resultados	29
<i>Salmonella typhimurium</i> promueve la activación de Akt en linfocitos B infectados	29
La fosforilación de YAP en linfocitos B infectados es dependiente de SopB y Akt	35
<i>Salmonella typhimurium</i> requiere de PI3K clase I para activar a Akt	38
SopB es suficiente para la activación de la vía Akt-YAP en linfocitos B	41
El complejo mTORC2 es indispensable para la activación de la vía Akt-YAP y la sobrevida de <i>Salmonella</i> en linfocitos B	46
SopB regula la activación sostenida de caspasa-1 y la secreción de citocinas en linfocitos B infectados.	49
<i>Salmonella</i> bloquea autofagia a través de la activación del complejo mTORC1 como mecanismo de sobrevida.	52

Discusión	55
Conclusiones	59
Perspectivas	60
Referencias	61

Índice de figuras

Figura 1.- <i>Salmonella</i> promueve la activación de Akt a través del efector SopB en linfocitos B.	33
Figura 2.- Akt es responsable de la fosforilación de YAP en linfocitos B infectados por <i>Salmonella</i>.	36
Figura 3. La activación de Akt por <i>Salmonella</i> es dependiente de PI3K clase I.	39
Figura 4. SopB promueve la activación de la vía Akt-YAP	44
Figura 5. El complejo mTORC2 es indispensable para la activación de la vía Akt-YAP y la sobrevivencia de <i>Salmonella</i> en linfocitos B.	47
Figura 6. SopB regula la activación sostenida de caspasa 1 y la secreción de citocinas en linfocitos B infectados.	50
Figura 7. <i>Salmonella</i> bloquea xenofagia como mecanismo de sobrevivencia.	52
Fig.8 <i>Salmonella</i> a través de SopB activa la vía Akt-YAP para regular la secreción de IL-1β.	57
Fig.9 <i>Salmonella</i> a través de SopB estaría regulando vías de señalización que favorecen su sobrevivencia dentro del linfocito B.	57

Abreviaturas:

AP-1	Activator protein 1
ATCC	American type culture collection
BAD	Bcl-2-associated death promoter
BSA	Bovine serum albumin
CARD	Caspase recruitment domain
Cdc42	Cell División Cycle protein 42
DAPI	4'6,-Diamino-2-fenilindol
DNA	Desoxirribonucleic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FcR	Fc receptor
FOXO1	Forkhead box protein O1
GFP	Green Fluorescence Protein
IgM	Inmunoglobulina M
IpaF	Ice protease activating factor
IPS	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i>
LB	Luria Bertani
LC3B	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B
LDH	Lactate Deshidrogenase
LPS	Lipopolisacarido
LRR	Leucine rich repeat

MDI	Multiplicidad de infección
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1
mTORC2	Mammalian target of rapamycin complex 2
MZ	Marginal zone
MZP	Marginal zone precursor
NBD	Nucleotide binding domain
NDP52	Nuclear domain 10 protein 52
NFκB	Nuclear factor Kb
NLR	Nod like receptor
NLRC4	Nod like receptor CARD containing protein 4
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffer solution
PDK1	Phosphoinositide dependent kinase 1
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
PIP3	Fosfatidil Inositol (3,4,5) trifosfato
PRR	Pattern recognition receptor
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
Rac1	Ras-Related C3 botulium toxin substrate 1
Rho G	Ras homology Growth-related
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
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
SSTT	Sistema de secreción tipo tres
TBS	Tris Buffer Solution
TLR	Toll like receptor
TNF α	Tumor necrosis factor α
TRITC	Tetramethylrhodamine
tRNA	Transfer ribonucleic acid
UFC	Unidades formadoras de colonia
WB	Western Blot
WT	Wild type
YAP	Yes associated protein

Resumen

Linfocitos B infectados por *Salmonella* no mueren por piroptosis como si ocurre con macrófagos infectados, esto porque en linfocitos B *Salmonella* bloquea el ensamblaje del inflammasoma NLRC4 a través de la regulación negativa de la transcripción del gen *Nlrc4*. En linfocitos B infectados, la fosforilación de Yap impide su función como co-activador transcripcional de la proteína p73, disminuyendo así la transcripción del gen *Nlrc4*, el procesamiento de caspase-1 y la producción de IL-1 β . Los efectores bacterianos involucrados en este fenómeno no han sido identificados ni el mecanismo que fosforila al co-activador transcripcional Yap. En este trabajo, describimos que el efector de *Salmonella* SopB promueve la activación a PI3K, PDK1 y mTORC2 para activar a Akt y fosforilar a Yap. Además, linfocitos B infectados con *Salmonella typhimurium* producen gran cantidad de IL-10 lo que indica que SopB regula el balance inflamación-anti-inflamación en linfocitos B infectados. Al mismo tiempo *Salmonella* regula xenofagia a través de la activación de mTORC1 para favorecer su supervivencia. Consecuentemente, la eliminación del gen *Rictor* en linfocitos B o de *sopB* en *Salmonella* favorece un eficiente control de la infección por *Salmonella*. Todos estos datos sugieren que *Salmonella* a través de SopB favorece su supervivencia en linfocitos B regulando negativamente la vía NLRC4-Caspasa-1-IL-1 β a través de la activación de la vía PI3K-Akt-Yap y regulando xenofagia a través de la activación de mTORC1.

Abstract

Salmonella-infected B cells do not go under pyroptosis as it occurs in infected macrophages, this because in B cells *Salmonella* blocks assembling of the NLRC4 inflammasome by down regulating the expression of *Nlrc4* gene. In *Salmonella*-infected B cells, phosphorylation of YAP prevents its function as transcriptional co-activator of p73, thus transcription of *Nlcr4* gene is downregulated, caspase-1 is not processed and IL-1 β production is blocked. The bacterial effectors involved in this phenomenon have been not identified neither the signaling mechanism that phosphorylate the transcriptional co-activator YAP. In this work, we describe that *Salmonella* effector SopB activates PI3K, PDK1 and mTORC2 to active AKT which phosphorylate YAP. Even more, *Salmonella*-infected B cells produce large amounts of IL-10. Consequently, conditional deletion of Rictor on B cells or pharmacological inhibition of AKT, PDK1 or mTORC1 allows an efficiently control *Salmonella* infection. All these results suggest that *Salmonella* through SopB favor its survival within B cells by impairing pyroptosis via the PI3K-Akt-YAP pathway and by activation mTORC1 to block xenophagy.

Introducción

Salmonella

Salmonella es un género bacteriano patógeno gram negativo que pertenece a la familia Enterobacteriaceae dentro del filo Proteobacteria y es el principal causante de enfermedades transmitidas por alimentos a nivel mundial. La infección por este microorganismo puede presentarse como una gastroenteritis autolimitante o una infección diseminada (fiebre tifoidea), siendo esta última la más peligrosa para la salud del hospedero. La presentación de la enfermedad depende del serovar de la bacteria y el organismo infectado, por ejemplo, mientras que en humanos *Salmonella entérica* serovar *typhimurium* (*Salmonella typhimurium*) causa un cuadro de gastroenteritis, en ratón causa un cuadro de infección diseminada parecido a la fiebre tifoidea por lo que es utilizado como modelo de estudio.¹ En humanos, la fiebre tifoidea resulta exclusivamente de la infección por las cepas *Salmonella typhi*, *Salmonella Paratyphi A, B, C* y *Salmonella Sendai* siendo el único reservorio. En otras especies animales podemos encontrar otros serovares causantes de infecciones tifoidales como *Salmonella gallinarum* en aves de corral, *Salmonella choleraesuis* en ganado porcino y *Salmonella dublin* en ganado vacuno.²

La infección se adquiere por la ingestión de alimentos o agua contaminados con materia fecal proveniente de personas enfermas; no existen reservorios animales, la principal fuente de la infección son los portadores asintomáticos y está altamente relacionado con una pobre higiene, carencia de un servicio de agua potable y a un saneamiento inadecuado. Aun cuando la fiebre tifoidea ha prácticamente desaparecido de los países industrializados, todavía se mantiene como un problema de salud pública serio en algunas regiones asiáticas de la extinta Unión Soviética, el sur y sureste asiático, África y Latinoamérica. De acuerdo a estimados recientes, 22 millones de casos ocurren cada año causando 216,000 muertes, predominantemente en niños en edad escolar y adultos jóvenes. Asia, con 274 casos por cada 100,000 habitantes tiene la más alta tasa de incidencia, seguido por el África subsahariana y Latinoamérica con 50 casos por cada 100,000 habitantes. La mayoría de los pacientes son capaces de infectar durante la primera semana de convalecencia, pero el 10% de los pacientes no tratados lo hace hasta tres meses después de la infección. Además del 2 al 5% de los pacientes se convierten en portadores permanentes.³

En México, según datos reportados por la Dirección General de Epidemiología hasta la semana veintidós del año 2017 se tenían registrados 23,607 casos de fiebre tifoidea, siendo

Tamaulipas el estado con mayor número de casos hasta el momento (5,153) y Durango el estado con menos casos registrados (14). Esto, aunado a la aparición de cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos que dificultan el tratamiento y control de la misma, indican que la fiebre tifoidea sigue siendo un problema de salud.

Invasión y diseminación de *Salmonella*

Salmonella es adquirida por la ingestión de agua y alimentos contaminados con materia fecal. Después de la ingestión, la bacteria sobrevive al pH ácido del estómago, una vez en el intestino, *Salmonella* compete con la microbiota por la colonización del mismo, para ello, promueve diferentes procesos como la secreción de IL-22 por parte del hospedero, la competencia por hierro y la generación de tetrationato como nuevo aceptor final de electrones.^{4,5} Estos procesos le permiten a *Salmonella* eliminar parte de la flora microbiana y colonizar el intestino. Ya colonizado el intestino, penetra el epitelio a través de las células M, las cuales por transitosis transportan la bacteria del lumen intestinal a las placas de Peyer del intestino.⁶ Interesantemente, *Salmonella* tiene la capacidad de, a través de la inyección de proteínas efectoras, promover la transformación de células epiteliales en células M lo que incrementa el número de estas células disponibles para el paso de la bacteria.⁷ Además del paso de *Salmonella* a través de las células M se han reportado otros procesos mediante los cuales la bacteria puede penetrar el epitelio intestinal. El primero de estos procesos implica la internalización de *Salmonella* por células no fagocíticas, en este caso células epiteliales, el cual es consecuencia de una respuesta celular caracterizada por rearrreglos del citoesqueleto de actina dependientes de Cdc-42 y Rac1. Esta respuesta es el efecto coordinado de una serie de proteínas bacterianas trasladadas al citoplasma de la célula hospedera a través de un sistema de secreción tipo tres. Estas proteínas llamadas SopB, SopE y SopE2 son las responsables de la entrada de la bacteria y presentan redundancia de tal manera que solo una cepa deficiente en las tres proteínas es incapaz de entrar a una célula no fagocítica.⁸

El segundo mecanismo involucra a células dendríticas que expresan el receptor CX3CR1, estas extienden sus dendritas a través de las uniones estrechas de las células epiteliales hacia el lumen del intestino para ingerir directamente a la bacteria y transportarla a los ganglios linfáticos.⁹ Una vez en la submucosa, *Salmonella* interactúa con células del sistema inmune como macrófagos y células dendríticas las cuales fagocitan a la bacteria y la transportan a todo el

sistema retículo endotelial favoreciendo su diseminación y la colonización de órganos como bazo, medula ósea e importantemente vesícula biliar.⁶ En esta última, a través de la formación de una biopelícula y la infección de células epiteliales de la pared de la vesícula se genera un estado de portador crónico asintomático que es capaz de excretar bacteria a través de las secreciones biliares e infectar a otras personas.¹⁰

Por otra parte, la inducción de muerte celular a los macrófagos es importante para la diseminación de *Salmonella*. Se ha demostrado que en etapas tempranas de la infección la bacteria induce un tipo de muerte celular denominado piroptosis a través de la activación de caspasa-1 mediante SipB, una proteína efectora de la IPS1.¹¹ La muerte celular por piroptosis se caracteriza por la fragmentación del DNA, daño en la membrana celular y secreción de IL-1 β ,¹² esto genera un ambiente pro inflamatorio que favorece el arribo de una mayor cantidad de macrófagos para ser infectados por *Salmonella*. Sin embargo se ha reportado que el ambiente vacuolar del macrófago promueve la variación fenotípica de *Salmonella*, por lo que una parte entra en un estado de persistencia, y el cual se caracteriza por ser un proceso metabólico no replicativo y multi drogoresistente que favorece la generación de un reservorio celular incapaz de inducir muerte celular.¹³

Factores de virulencia de *Salmonella*

La habilidad de *Salmonella* de causar enfermedad está relacionada principalmente con la adquisición horizontal de genes de virulencia los cuales se agrupan en regiones denominadas islas de patogenicidad, las cuales se definen como un grupo de genes dentro del cromosoma bacteriano que codifican determinantes responsables de interacciones específicas con el huésped y son requeridos para la virulencia bacteriana en un modelo animal dado. Del balance de muchos de los productos de estos genes actuando en el momento y lugar correcto depende la supervivencia de la bacteria. Hasta el momento se han identificado, veintiún islas de patogenicidad de *Salmonella* (IPS) las cuales generalmente tienen un contenido menor de GC (entre 37 y 47 %) que el resto del cromosoma (52%) y están normalmente localizados entre genes de tRNAs.^{1, 14} La mayoría de las islas de patogenicidad que han sido reportadas últimamente han sido el resultado de análisis informáticos y aun se requieren análisis biológicos que permitan definir la función de muchos de los genes encontrados. En macrófagos se sabe que los principales factores que activan a las IPSs

son la falta de nutrientes y la osmolaridad aunque también se han reportado diferentes factores como los niveles de oxígeno, la temperatura, pH ácido y la concentración de cationes.¹⁵

La IPS1 es la mejor caracterizada de las veintiuno y codifica para un sistema de secreción tipo tres,¹⁶ proteínas efectoras traslocadas a través de este sistema permiten la penetración bacteriana de células no fagocíticas, principalmente del epitelio intestinal. La IPS2 al igual que la IPS1 codifica para un sistema de secreción tipo tres, el cual es utilizado por *Salmonella* para la translocación de proteínas de la vacuola hacia el citoplasma;¹⁷ IPS3 e IPS4 codifican para proteínas requeridas para el crecimiento y la supervivencia dentro de la célula hospedera. La IPS5 codifica para una serie de proteínas efectoras involucradas en la enteropatogenesis, importantemente SopB la cual es traslocada al citoplasma de la célula por medio del sistema de secreción tipo tres, se codifica en la IPS5. SopB es una fosfatasa de inositidos capaz de mediar la inflamación y secreción de fluidos en la mucosa intestinal.^{18, 19}

Respuesta inmune innata contra *Salmonella*

La respuesta inmune innata contra *Salmonella* se inicia en el epitelio, se ha demostrado que la interacción entre la bacteria y las células del epitelio intestinal llevan al encendido de diferentes vías de señalización que conllevan a la activación de factores de transcripción como NF- κ B y AP-1. La activación de estos factores es clave en la activación de mecanismos de inflamación que resultan en la secreción de IL-8 el cual es un potente quimioatrayente de neutrófilos.⁶

Después del paso de *Salmonella* a través del epitelio intestinal esta es fagocitada por macrófagos, los cuales se activan inmunológicamente por citocinas y exhiben un marcado aumento en su capacidad microbicida, degradativa y secretoria. El reconocimiento de *Salmonella* por el sistema inmune innato es mediado por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que se unen a moléculas conservadas de microorganismos llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), siendo los receptores de este tipo más conocidos los receptores tipo Toll (TLRs). *Salmonella* expresa diversos PAMPs siendo los más notables LPS, antígeno Vi, flagelina, fimbria, DNA bacteriano y el SSTT.¹⁵ En el caso de la infección por *Salmonella* los dos TLRs importantes son TLR4 y el TLR5, como se pone en evidencia ya que en ratones que carecen de estos receptores se ha observado una mayor susceptibilidad a la infección por

Salmonella. TLR4 reconoce al lipopolisacárido mientras que TLR5 reconoce a la flagelina, como respuesta a estas moléculas los TLRs activan vías de señalización que llevan a la activación de factores de transcripción que resulta en la liberación de citocinas inflamatorias como IL-1 β y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) lo que favorece el control de la infección por parte de los macrófagos.²⁰

Los macrófagos pueden además reconocer a *Salmonella* a través del receptor intracelular NLRC4. Esta proteína (también llamada IPAF) fue identificada en el 2001 como un nuevo miembro de la familia de los NLRs.^{21, 22} Como todos los miembros de esta familia, NLRC4 está conformado por tres dominios; el dominio CARD (residuos 1-88), el cual interactúa con el dominio CARD de caspasa 1, un dominio central NBD (residuos 163-467) y un dominio carboxilo final que contiene al menos 13 repetidos ricos en leucina los cuales son los encargados del reconocimiento del ligando (residuos 656-1024).²²

NLRC4 detecta a flagelina y otras proteínas como Rod que la bacteria transloca de la vacuola al citosol de la célula hospedera a través del sistema de secreción tipo tres. El reconocimiento de la flagelina por NLRC4 lleva a la activación de caspasa-1 y por ende a muerte celular por piroptosis, el cual se caracteriza por fragmentación del DNA, daño en la membrana celular y secreción de citocinas como IL-1 β e IL-18.²³

Inicialmente NLRC4 fue descrito como una molécula con capacidad proapoptótica,²⁴ para su transcripción participan la familia de factores de transcripción p53, incluidos p53 y p73,²⁵ sin embargo la transcripción más eficiente de los genes blancos de p73 se produce cuando p73 heterodimeriza con la proteína proapoptótica YAP y se unen a la región promotora blanco.^{26, 27} Por otra parte, la regulación negativa de la expresión de los genes blanco de p73/YAP involucra la fosforilación de YAP, este proceso disocia a YAP de p73 y favorece su unión a la proteína 14-3-3 la cual la transporta hacia el citosol donde es incapaz de llevar a cabo su papel como coactivador transcripcional.²⁸

Akt

Akt es una serina-treonina cinasa que juega un papel central en la proliferación y sobrevivencia celular. El gen que codifica para Akt es homólogo al oncogen v-akt transducido por AKT8, un retrovirus transformante en ratón que fue originalmente descrito en 1977.²⁹ Existen tres isoformas, Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β) y Akt3 (PKB γ), todas codificadas por genes

independientes y las cuales fueron clonadas y caracterizadas en 1991 por tres grupos de investigación independientes.³⁰

Las tres isoformas comparten estructuras similares, un dominio regulatorio N-terminal el cual incluye un dominio homólogo a plextrina (PH); una región bisagra que conecta al dominio PH a un dominio serina/treonina cinasa; y un dominio C-terminal necesario para la inducción y el mantenimiento de la actividad de cinasa. Akt1 es expresada ubicuamente en altos niveles. En contraste Akt2 es altamente expresada en tejidos sensibles a insulina incluyendo el hígado, musculo esquelético y tejido adiposo. Akt3 es expresado principalmente en el cerebro y testículos y presenta bajos niveles de expresión en tejido intestinal y tejido muscular.³⁰

La homología estructural entre las diferentes isoformas se extiende al mecanismo de activación. Todas las isoformas poseen dominios PH con especificidades similares por inositidos fosforilados en la posición D3 (PI3P) productos de la acción de la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K). La familia de proteínas PI3K es una familia de enzimas que fosforilan la posición D3 de los fosfoinositidos. La familia PI3K se divide en tres subfamilias; PI3K de clase I, PI3K de clase II y PI3K de clase III. Solo la subfamilia PI3KI es capaz de producir PIP3 una molécula que recluta proteínas con dominios PH a la membrana celular. PI3K clase I se subdivide a su vez en PI3K clase IA y PI3K clase IB. Las proteínas de la familia PI3K clase IA son heterodímeros formados por una subunidad catalítica (p110 α , p110 β o p110 δ) y una subunidad regulatoria (p85 α , p85 β or p55 γ).³¹ Además de la interacción con PI3P Akt requiere de dos fosforilaciones, la primera por la cinasa dependiente de fosfoinositido 1 (PDK1), una cinasa río abajo de PI3K que contiene un dominio PH, la cual fosforila todas las isoformas de Akt en la treonina 308 y que es crítica para la activación de Akt.³² La segunda fosforilación en una serina en la posición 473, por la cinasa mTORC2, es requerida para la activación máxima.³³ Las tres isoformas de Akt se expresan en el linfocito B y sus funciones son al parecer redundantes.³⁴

Los linfocitos B

Los linfocitos B son células que juegan un papel central en la respuesta inmune adaptativa, su principal función es la producción de anticuerpos pero también tiene la capacidad de funcionar como célula presentadora de antígenos. Estas células se generan en la médula ósea, en este sitio son células inmaduras, cuando las células B egresan de la médula ósea, migran a los

órganos linfoides secundarios, como bazo y nódulos linfáticos, donde se diferencian a linfocitos B maduros.³⁵

Los linfocitos B maduros en la periferia se dividen principalmente en dos linajes: linfocitos B1 y B2. Los linfocitos B1 constituyen aproximadamente el 5% de los linfocitos B de bazo y se subdividen en linfocitos B1a y linfocitos B1b. Los linfocitos B1 pueden contribuir a la generación de la respuesta de anticuerpos a antígenos T independientes.

Por otra parte, los linfocitos B2 se subdividen en células precursoras de la zona marginal (MZP), linfocitos B de zona marginal (MZ), linfocitos B foliculares I (Fol-I) y linfocitos B foliculares II (Fol-II). Los linfocitos B de zona marginal se consideran células con ciertas capacidades similares a las de la respuesta inmune innata, ya que se ha observado que son capaces de formar fagolisosomas y de eliminar bacteria, además los linfocitos de zona marginal transportan antígenos en forma de complejos inmunes y están involucrados en las respuestas T-dependiente. Por su parte los linfocitos B foliculares son células que poseen un tiempo de vida media, están involucrados en las respuestas T-13 dependientes y presentan antígenos de origen proteico a los linfocitos T, para generar una respuesta efectora y de memoria.³⁶

Antecedentes directos

Durante la infección por *Salmonella*, los linfocitos B participan generando anticuerpos en contra tanto de antígenos no proteicos, como el antígeno somático O, así como contra antígenos proteicos, como proteínas de choque térmico, flagelina y proteínas de la membrana externa bacteriana como porinas o la proteína OmpA.³⁷⁻³⁹ Estos anticuerpos contribuyen a la ingestión bacteriana vía endocitosis mediada por receptor Fc (FcR) y con ello a una mejor actividad bactericida por parte de la célula fagocítica.

Ensayos *in vitro* han demostrado que los linfocitos B son capaces de interiorizar a *Salmonella*,⁴⁰ en nuestro laboratorio se ha comprobado que durante la infección *in vivo* tanto linfocitos B1 como B2 se infectan, además se ha demostrado que *Salmonella* induce su propia entrada en los linfocitos B. Este proceso de internalización es similar al usado por la bacteria para infectar células epiteliales del intestino, requiere de la IPS1 y se caracteriza por la inducción de un ondulamiento localizado (*membrane ruffling*), macropinocitosis y la formación de grandes fagosomas.⁴¹ Una vez que la bacteria ha sido interiorizada la vacuola que contiene a *Salmonella* mantiene características endosomales-lisosomales después de la fusión fagolisosomal⁴² y datos

obtenidos en el modelo de infección *in vivo* indican que *Salmonella* es capaz de permanecer en el interior de los linfocitos B hasta 60 días posteriores a la infección.⁴³

Hallazgos de nuestro laboratorio muestran que *Salmonella* es capaz de modular la respuesta inflamatoria en linfocitos B disminuyendo la expresión de NLRC4 lo cual evita la maduración eficiente de IL-1 β y la citotoxicidad en estas células, favoreciendo su supervivencia, persistencia y diseminación en el hospedero. Cuando se analizó la regulación transcripcional de NLRC4 se encontró que en linfocitos B infectados por la bacteria había un aumento en la fosforilación de YAP, el coactivador necesario para su transcripción.⁴⁴ El mecanismo mediante el cual *Salmonella* está promoviendo la fosforilación de YAP y modulando la piroptosis requiere del sistema de secreción tipo tres codificado por la isla de patogenicidad de *Salmonella* 1, por lo cual nuestra proteína candidata esta entre las proteínas translocadas por este sistema de secreción.

Bajo condiciones que inducen la transcripción de los genes de la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* se encontró un incremento en la expresión de NLRC4, lo cual sugiere que aun cuando se requiere del sistema de secreción tipo tres la proteína efectora responsable de la disminución en la expresión del NLRC4 no está bajo el control transcripcional de la IPS1. Bajo este criterio la proteína que más captó nuestra atención fue la fosfatasa de inositidos SopB, una proteína codificada en la isla de patogenicidad de *Salmonella* 5 y que es translocada desde etapas tempranas de la infección hacia el citoplasma de la célula por medio del sistema de secreción tipo tres codificado por la IPS1.¹⁹ En el citosol de la célula esta proteína participa en los rearrreglos del citoesqueleto que permiten la entrada de la bacteria, esto a través de la interacción con Cdc42 y RhoG,^{8, 45, 46} además, mediante la hidrólisis de fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato, el cual es un inhibidor de la secreción de cloruros dependiente de Ca²⁺ en células epiteliales, SopB es capaz de regular la secreción de fluidos en el epitelio intestinal jugando un papel importante en la enteropatogénesis de la infección por *Salmonella*.¹⁸

El uso de mutantes de *Salmonella* que carecen de la proteína SopB permitió demostrar que esta proteína protege a las células epiteliales intestinales de la apoptosis mediante la activación sostenida de Akt.^{47, 48} Además mediante el desarrollo de inhibidores de cinasas que previenen el crecimiento de patógenos no relacionados como *Salmonella typhimurium* y *Mycobacterium tuberculosis* y realizando un rastreo con RNAs de interferencia del conjunto de cinasas humanas se demostró que el crecimiento bacteriano intracelular es controlado por una red de cinasas alrededor de Akt⁴⁹ por lo que sería lógico que en el transcurso de la evolución

Salmonella haya adquirido la capacidad de modular los mecanismos de apoptosis que le permitan crear un nicho dentro del hospedero.

Inicialmente se demostró que la activación de Akt por parte de SopB es insensible al inhibidor wortmannina y requiere de PDK1 y del complejo Rictor-mTOR, lo cual nos indica que esta activación por parte de SopB es independiente de PI3K de clase I,⁴⁷ al realizar un análisis más profundo, se observó que la activación de AKT por *Salmonella* requiere de la modulación, por parte de SopB, de una gran cantidad de cinasas del hospedero y que las cinasas requeridas para esta activación dependen de la célula infectada.⁵⁰ Los blancos mejor caracterizados de Akt son FoxO y Bad los cuales al ser fosforilados se unen a la proteína 14-3-3. A través de purificación por afinidad se pudo identificar a la proteína YAP como un sustrato de Akt,⁵¹ como lo mencionamos anteriormente, YAP es requerido como heterodimero con p73 para la eficiente transcripción de NLRC4. Una vez que YAP es fosforilado por Akt se uniría a la proteína 14-3-3 lo que llevaría a la retención de YAP en el citoplasma impidiendo que lleve a cabo su papel como coactivador transcripcional. Además, en células transfectadas con una variante de Akt constitutivamente activa no se encuentra a la proteína YAP en las regiones promotoras de sus genes blanco.⁵²

Dado que la cinasa encargada de la fosforilación de YAP es Akt, la cual anteriormente ha sido reportada como una proteína activada por el efector SopB de *Salmonella*, y para estudiar el posible papel de SopB en este proceso de modulación del inflammasoma NLRC4, durante la maestría generamos una cepa de *Salmonella* que carece del gen que codifica para la proteína SopB. Esta cepa al infectar linfocitos B es incapaz de bloquear la secreción de IL-1 β , lo cual correlaciona con el hecho de que esta cepa es incapaz de sobrevivir en el linfocito B, tanto *in vitro* como *in vivo*, el cual estaría limitando la infección bacteriana en un proceso IL-1 β dependiente.

Justificación

Salmonella es capaz de sobrevivir en los linfocitos B limitando la respuesta inflamatoria mediada por el eje NLRC4-Caspasa-1-IL-1 β , sin embargo hasta la fecha se desconocen los elementos bacterianos responsables de la modulación de los procesos proinflamatorios que favorecerían la permanencia de *Salmonella* dentro del hospedero, por lo tanto es importante estudiar las vías de señalización mediante las cuales la bacteria modula los procesos inflamatorios y de supervivencia dentro de estas células para convertirlas en un nicho.

Hipótesis

Salmonella a través del efector SopB activa la vía Akt-YAP bloqueando así el eje NLRC4-Caspasa-1-IL-1 β .

Objetivos

Objetivo general

Analizar la vía de señalización Akt-YAP en linfocitos B infectados con *Salmonella typhimurium*.

Objetivos particulares

- 1.- Evaluar la activación de Akt en linfocitos B infectados con *Salmonella typhimurium*.
- 2.- Evaluar la fosforilación de YAP en linfocitos B infectados con *Salmonella typhimurium*.
- 3.- Analizar el papel de PI3K de clase I en la activación de Akt en linfocitos B infectados con *Salmonella typhimurium*.
- 4.- Evaluar si SopB es suficiente para la activación de la vía Akt-YAP en linfocitos B.
- 5.- Evaluar el papel del complejo mTORC2 en la activación de la vía Akt-YAP en linfocitos B infectados con *Salmonella typhimurium*.
- 6.- Analizar el eje Caspasa1-IL-1 β en linfocitos B infectados con *Salmonella typhimurium*.
- 7.- Evaluar xenofagia en linfocitos B infectados con *Salmonella typhimurium*.

Materiales y métodos

Cepas de ratón.

En este trabajo se usaron ratones hembras de la cepa BALB/c o de la cepa STOCK *Cd19^{tm1(cre)Cgn}Rictor^{tm1.1Klg}* de 6-8 semanas de edad. La cepa STOCK *Cd19^{tm1(cre)Cgn}Rictor^{tm1.1Klg}* se generó en las instalaciones de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio mediante la cruce de las cepas STOCK *Rictor^{tm1.1Klg}/SjmJ* y B6.129P2(C)-*Cd19^{tm1(cre)Cgn}/J*.

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

En este trabajo se utilizaron las cepas *Salmonella entérica* Serovar *Typhimurium* (*Salmonella typhimurium*) ATCC 14028 y la cepa *Salmonella entérica* Serovar *Typhimurium* (*Salmonella typhimurium*) ATCC 14028 *ΔsopB*. La cepa *Salmonella typhimurium ΔsopB* fue generada en nuestro laboratorio usando el sistema de recombinación λ Red.⁵³ Para los ensayos de infección se tomó una colonia en agar Luria Bertani (LB), se creció en 3ml de medio de cultivo LB líquido y se creció toda la noche en agitación a 37°C, al día siguiente se realizó una dilución 1:30 en medio LB líquido fresco y el cultivo se continuó hasta una densidad óptica de 0.6 a 540nm, a la cual, la bacteria ha alcanzado la fase logarítmica. Esta misma densidad óptica se utilizó para calcular la multiplicidad de infección deseada.

Obtención de células primarias.

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, se extrajo el bazo, se disgregó y se obtuvo una suspensión celular. Los linfocitos B se purificaron por selección negativa utilizando anticuerpos acoplados a perlas magnéticas (Milteny Biotec). Los linfocitos B purificados se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (RP10)(Gibco).

Ensayos de infección, invasión y sobrevida.

1×10^6 linfocitos B se colocaron en tubos Eppendorf y se infectaron en suspensión con *Salmonella* a las multiplicidades de infección (MDI) indicadas en cada experimento (10, 25 o 50) en 700 μ l de medio RP10. Después de 30 minutos de contacto célula-bacteria las células fueron lavadas dos

veces con PBS-gentamicina (80µg/ml) (Sigma Aldrich) para eliminar los remanentes de bacteria extracelular y el cultivo se continuó en medio RP10 fresco suplementado con gentamicina (80µg/ml). Para los ensayos de sobrevivencia bacteriana se trataron los linfocitos B infectados con 200 µl de PBS-Triton X-100 al 2% (Sigma Aldrich) y el lisado celular se sembró en cajas LB agar para recuperar las unidades formadoras de colonias (UFCs) 1, 3 y 24 horas post-infección. El porcentaje de sobrevivencia se calculó usando la fórmula (UFCs a 24h/ UFCs a 1h X 100) y el índice de invasión usando la fórmula (UFCs Δ sopB 1h post-infección/UFCs WT 1h post-infección).

Plasmidos.

En este estudio se utilizó el plásmido pcDNA6-sopB el cual tiene clonado el gen *sopB* de *Salmonella typhimurium* 14028.

Determinación de citocinas.

Los niveles de IL-1 β , IL-6 e IL-10 en el sobrenadante de los cultivos de linfocitos B infectados se cuantificaron mediante el kit de detección por perlas magnéticas Mouse Cytokine Magnetic Bead Panel (Milliplex, MCYTOMAG-70K).

Ensayo de citotoxicidad.

Linfocitos B fueron infectados a la multiplicidad de infección indicada. 24 horas postinfección la citotoxicidad fue determinada por un ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) (Promega, G1780). El porcentaje de citotoxicidad se calculó usando la siguiente fórmula: porcentaje de liberación = (liberación experimental de LDH – liberación espontánea de LDH) / (liberación máxima de LDH – liberación espontánea de LDH) x 100%.

Western Blot.

Proteínas de linfocitos B de cada experimento fueron obtenidas usando el kit NE-PER Protein Extraction Reagent kit (Thermo Fisher, 78833) siguiendo las indicaciones de la compañía y solubilizadas en amortiguador Laemmli. Las muestras fueron separadas en geles de poliacrilamida y transferidas a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Las membranas fueron bloqueadas con albumina de suero bovino (BSA 1%) diluida en amortiguador

TBS con 0.1% de Tween por una hora a temperatura ambiente. Después las membranas se incubaron con alguno de los siguientes anticuerpos: anti pAkt S473 (Cell Signaling, 4060S), anti pAkt T308 (Cell Signaling, 130385), anti Akt (Santa Cruz Biotechnology, SC-8312), anti pYap S127 (Cell Signaling, 4911), anti Yap (Santa Cruz Biotechnology, SC-15407), anti p-p85 Y458 (Cell Signaling, 4228), anti p85 (Cell Signaling, 4257), anti p110 δ (Biolegend, 664902), anti caspasa-1 (Abcam, ab108362), anti actina (Santa Cruz Biotechnology, SC-1615), anti LC3B (Thermo Scientific, PA1-16930), anti p62 (Cell Signaling, 5114) o anti pS6 S235/236 (Cell Signaling, 4885). Las proteínas fueron detectadas por quimioluminiscencia (Promega, W1001) usando el Sistema ChemiDoc imaging system (BioRad Laboratories) y analizadas usando el software ImageLab (BioRad Laboratories).

Inmunofluorescencia.

Linfocitos B de cada experimento fueron fijados con paraformaldehído (4%). Las células fijadas se adhirieron a portaobjetos pretratados con poli-L-lisina (Sigma, P-1524) y se permeabilizaron con metanol. Una vez permeabilizadas se bloquearon con albumina de suero bovino y se incubaron toda la noche a 4°C con alguno de los siguientes anticuerpos: anti pAkt S473 (Cell Signaling, 4060S), anti pAkt T308 (Cell Signaling, 13038S), anti pYAP S127 (Cell Signaling, 4911S) o anti-PIP3 (Echelon, Z-P345b). Después de la incubación las células se lavaron y se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo TRITC por una hora a temperatura ambiente. Después de la incubación se lavaron los anticuerpos y se incubaron con DAPI (Molecular Probes, D1306) para teñir el núcleo. Las imágenes fueron obtenidas usando un microscopio confocal Olympus. Las imágenes se analizaron usando el software Image Pro Plus e ImageJ (NIH).

Transfección.

1×10^6 células de la línea A20 (ATCC TIB-208) fueron transfectadas con un microgramo del plásmido pcDNA6-sopb por electroporación usando el Sistema Amaxa Nucleofector (Lonza, Allendale, NJ) siguiendo las indicaciones del fabricante. Después de la transfección las células se resuspendieron en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino (10%).

Análisis estadístico

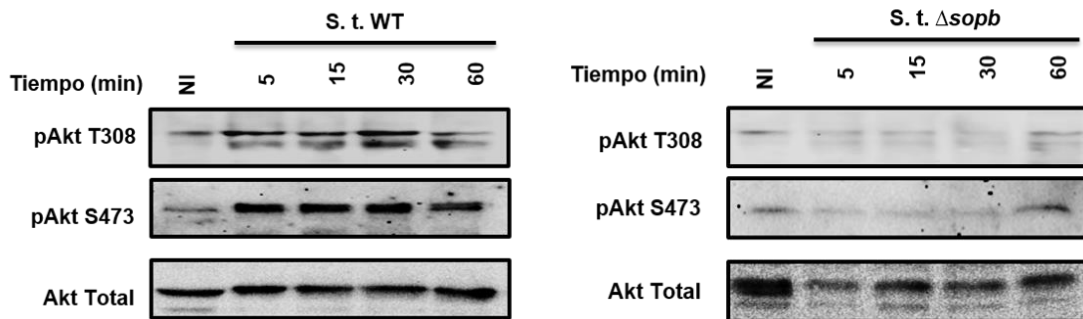
Los datos representan la media \pm SD y fueron analizados usando la prueba t de Student o ANOVA dependiendo del experimento. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

Resultados

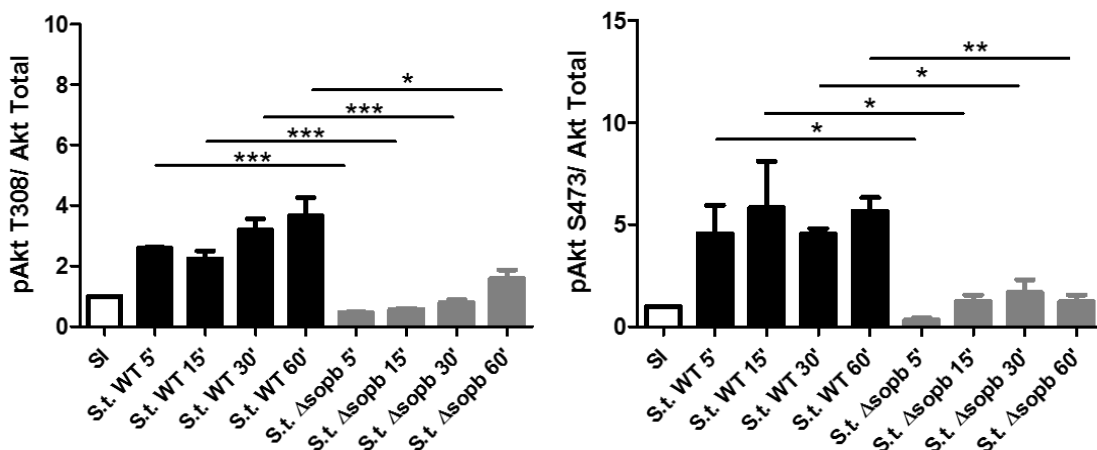
Salmonella typhimurium promueve la activación de Akt en linfocitos B infectados.

Como primer paso decidimos evaluar si, como hipotetizamos, *Salmonella* promueve la activación de Akt en linfocitos B a través del efector SopB. Para ello, infectamos linfocitos B con *Salmonella typhimurium* WT o *Salmonella typhimurium* Δ sopB y evaluamos la activación de Akt mediante western blot (Fig.1A) e inmunofluorescencia (Fig.1C-F) usando anticuerpos específicos dirigidos contra las fosforilaciones en la treonina 308 y la serina 473. En linfocitos B infectados con *Salmonella typhimurium* WT observamos una activación sostenida de Akt desde los 5 hasta los 60 minutos post-infección (Fig.1A,C,D), mientras que en aquellos infectados con la cepa Δ sopB no se observa este incremento en la activación de Akt (Fig.1A, E, F) lo cual nos indica que SopB es el efector responsable de la activación de Akt en los linfocitos B infectados por *Salmonella typhimurium*.

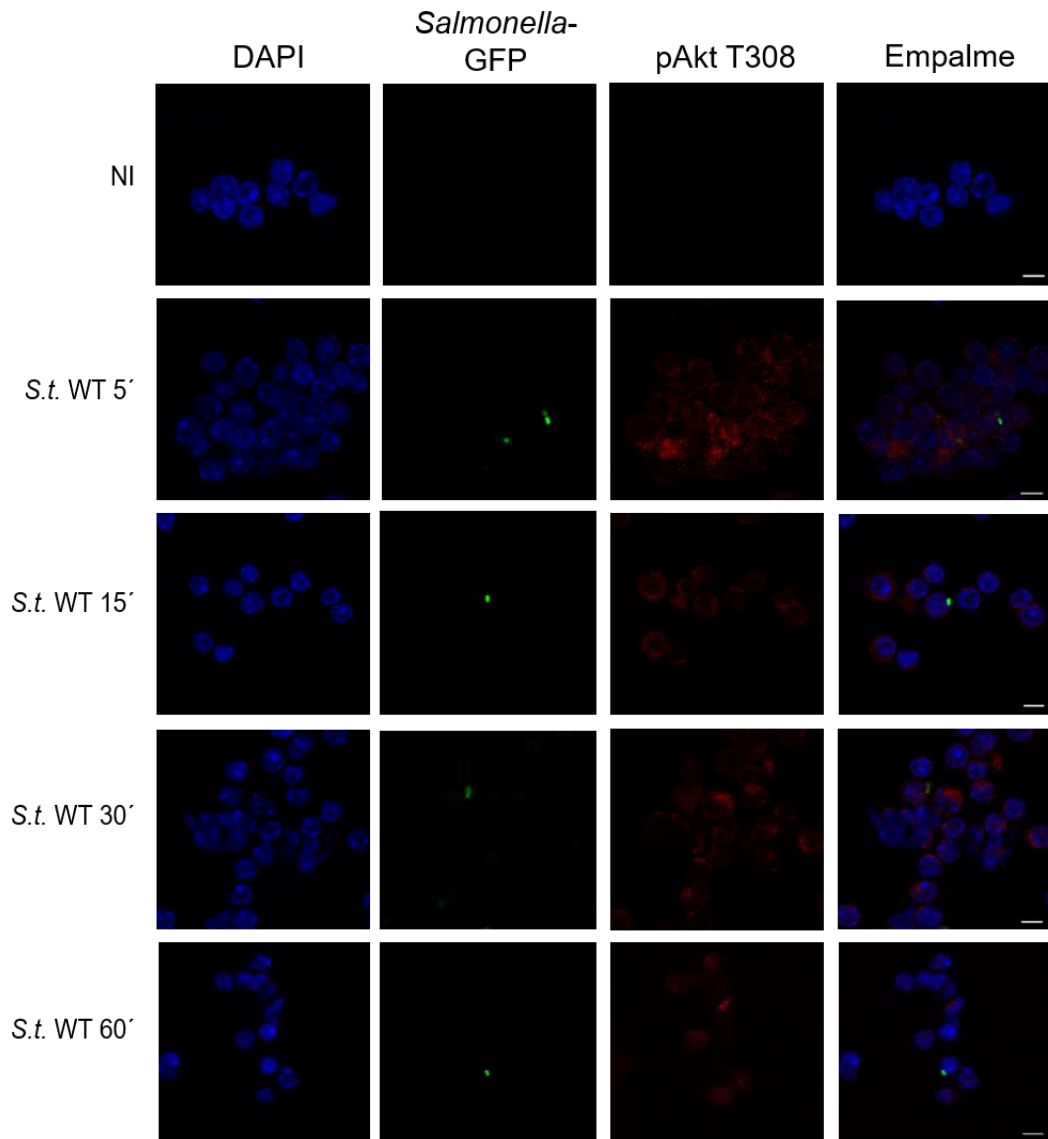
A



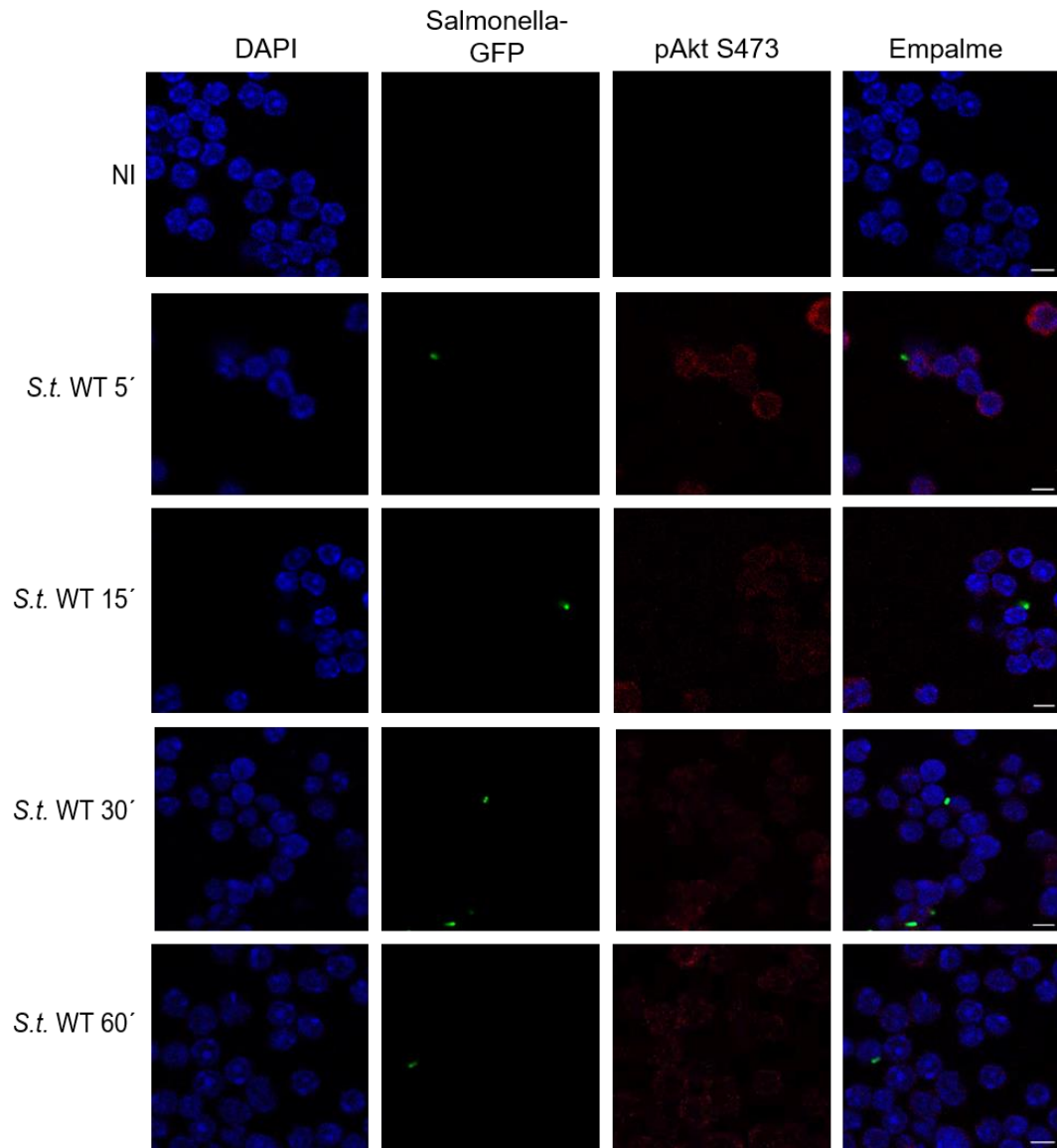
B



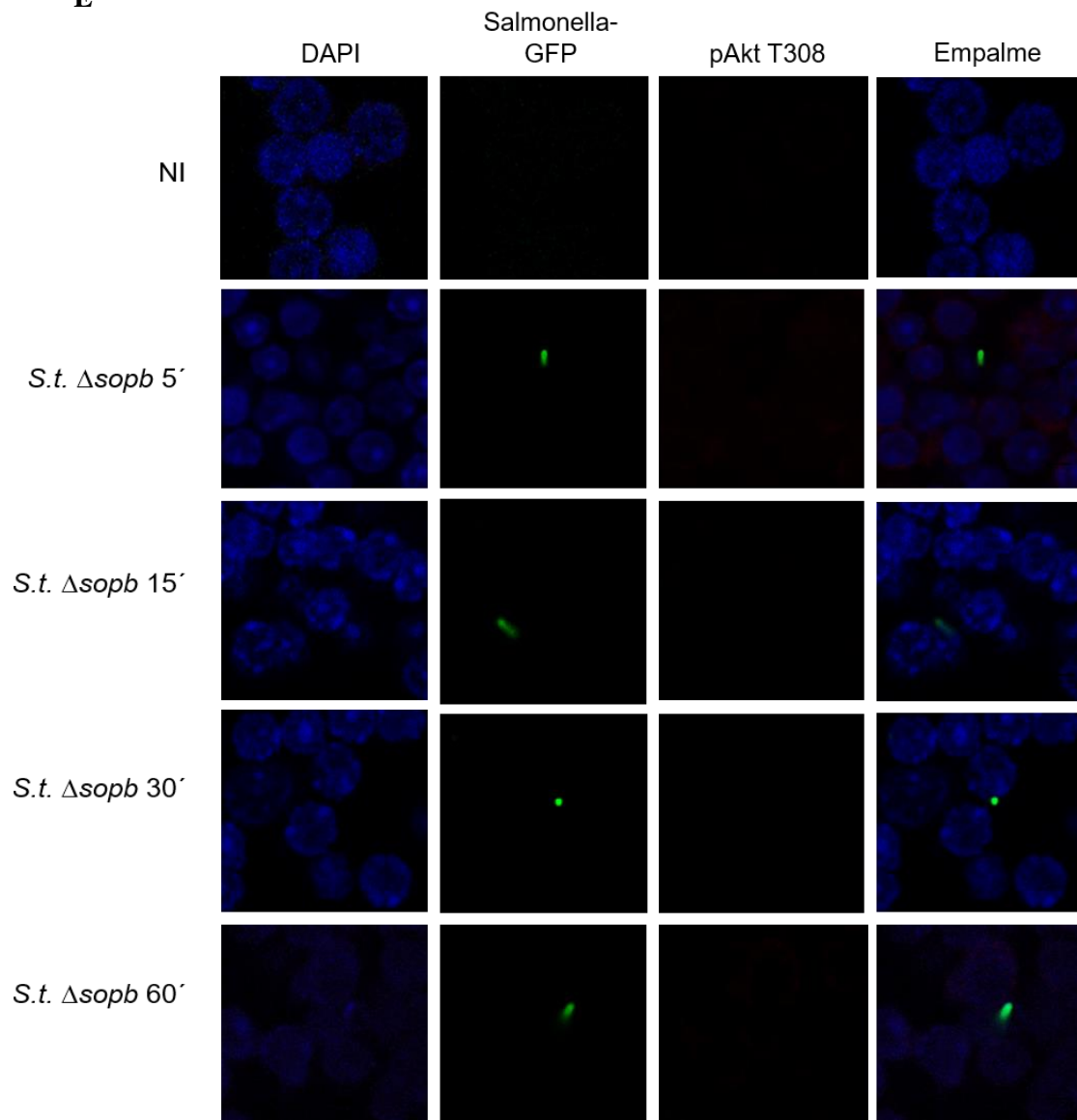
C



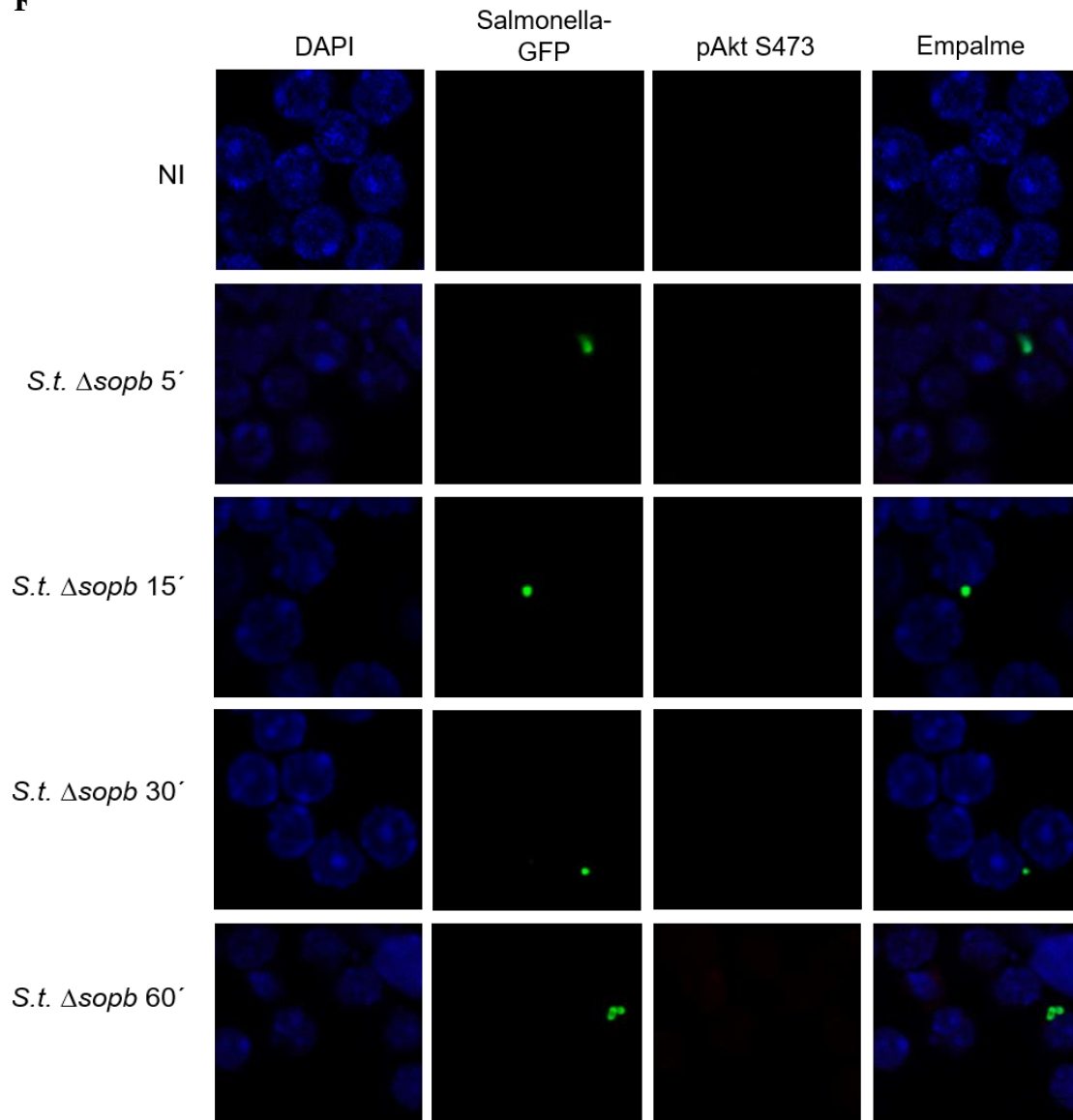
D



E



F



G

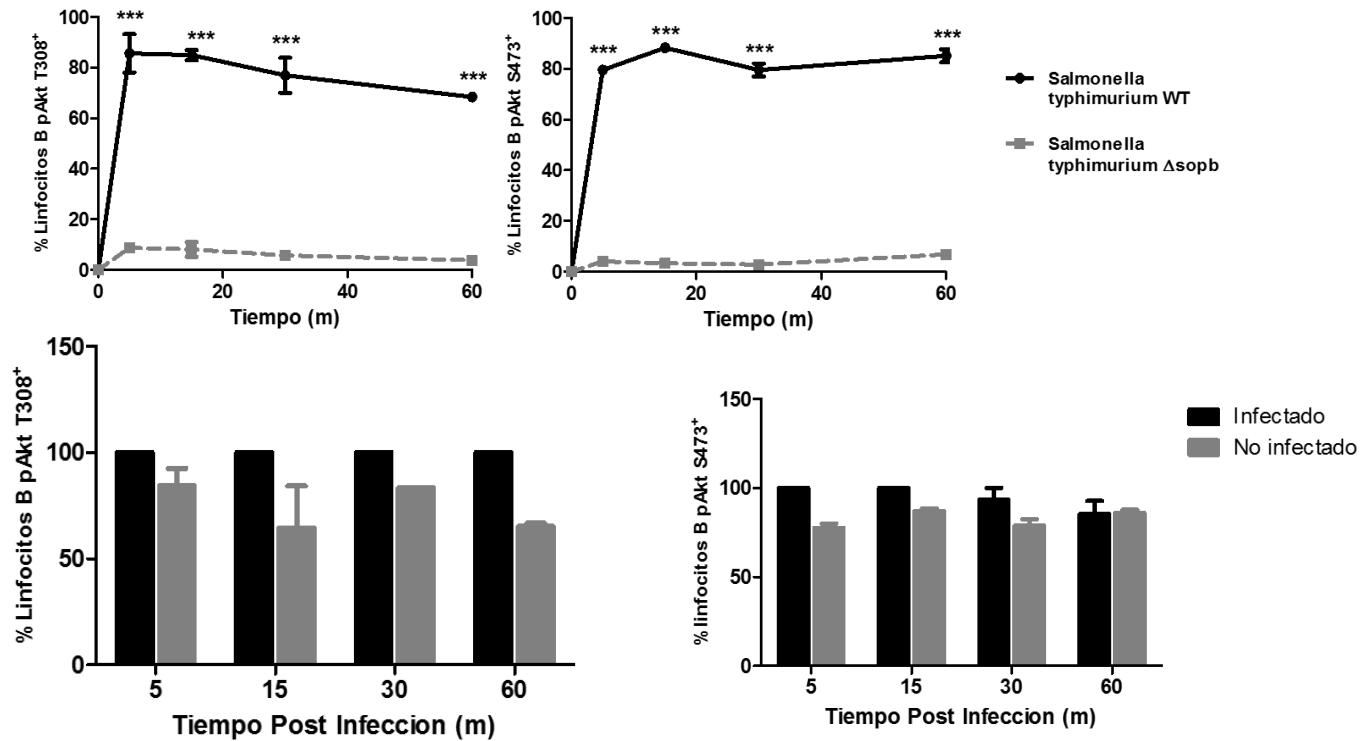


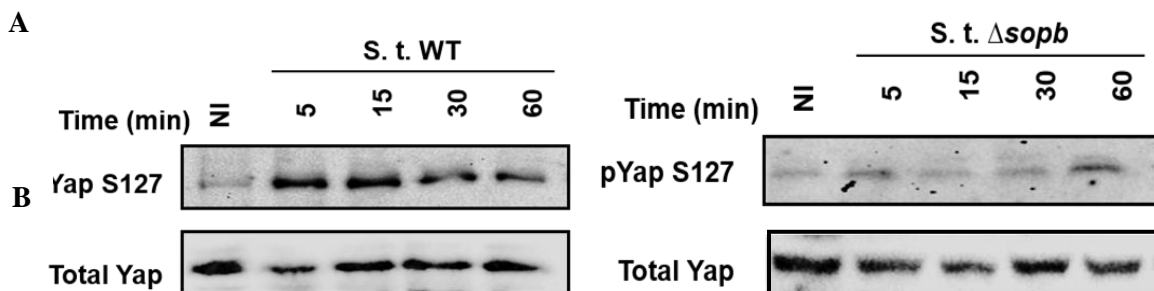
Figura 1.- *Salmonella* promueve la activación de Akt a través del efector SopB en linfocitos

B. A) Linfocitos B fueron infectados a una MDI de 50 con *Salmonella typhimurium WT* o *Salmonella typhimurium ΔsopB*. A los tiempos indicados se extrajo proteína y los niveles de pAkt T308 y pAkt S473 se evaluaron por Western Blot. **B)** Densitometria de la figura A mostrando los niveles de expresión de las proteínas pAkt T308 y pAkt S473 relativos a la expresión de Akt total y normalizados a la expresión del control (sin infectar). **C)** Linfocitos B fueron infectados a una MDI de 50 con *Salmonella typhimurium WT* (**C, D**) o *Salmonella typhimurium ΔsopB* (**E, F**). A los tiempos indicados las células se fijaron y los niveles de expresión de pAkt T308 (**C, E**) y pAkt S473 (**D, F**) se evaluaron por microscopia confocal. **G)** Porcentaje de linfocitos B infectados en **C, D, E** y **F** que expresan pAkt T308 o pAkt S473. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

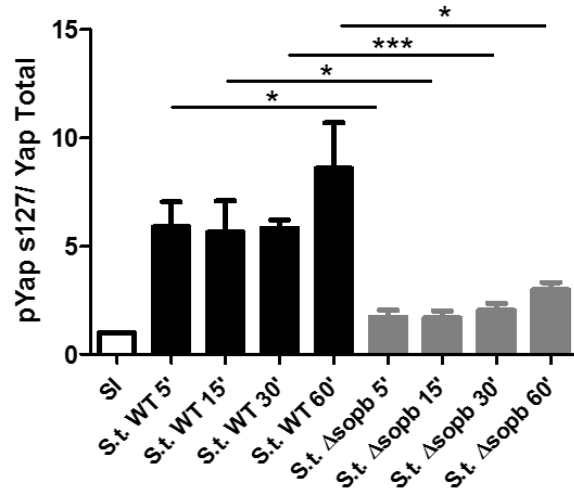
La fosforilación de YAP en linfocitos B infectados es dependiente de SopB y Akt.

Una vez que habíamos establecido que a través del efector SopB *Salmonella* promueve la activación de Akt, decidimos evaluar si SopB además era el efector responsable de promover la fosforilación de YAP. Siguiendo la misma aproximación experimental que en el objetivo pasado, evaluamos la fosforilación de YAP en linfocitos B infectados con *Salmonella typhimurium* WT o *Salmonella typhimurium* Δ sopB usando un anticuerpo dirigido contra la fosforilación en la serina 127. Al igual que con la activación de Akt, observamos una fosforilación sostenida de YAP en tiempos tempranos de la infección con *Salmonella* WT y no en aquellos linfocitos B infectados con *Salmonella* Δ sopB (Fig.2A). De esta manera podemos concluir que SopB promueve la fosforilación de YAP probablemente a través de la activación de Akt.

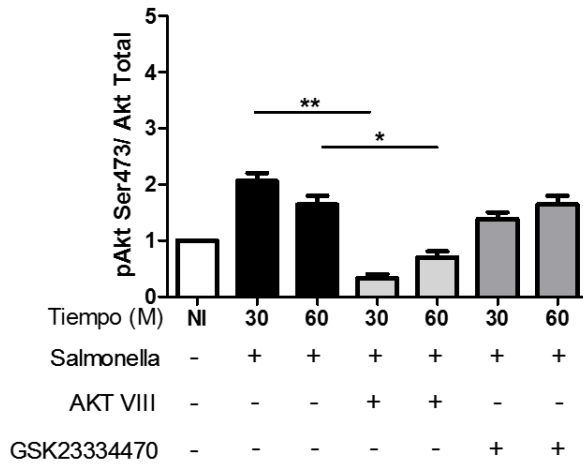
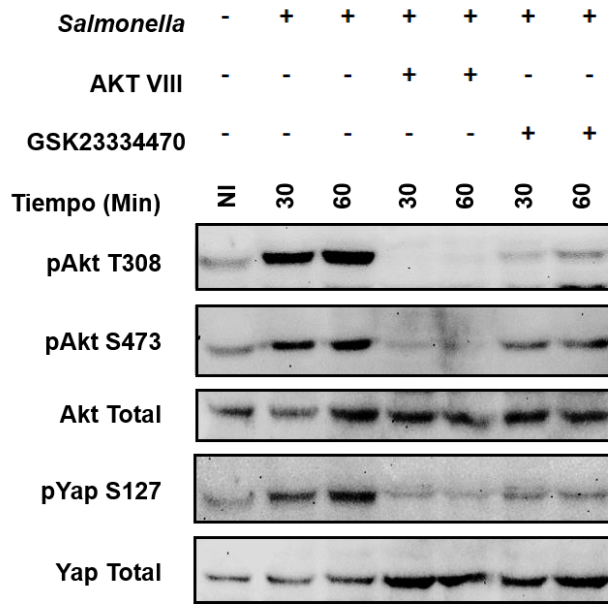
Para verificar que efectivamente Akt es la cinasa responsable de la fosforilación de YAP en linfocitos B infectados con *Salmonella typhimurium*, analizamos la fosforilación de YAP en linfocitos B pretratados con el inhibidor de Akt AKT VIII o con el inhibidor de PDK1 GSK23334470 y después infectados con *Salmonella typhimurium* WT. Mediante western blot pudimos observar que cuando Akt o PDK1 (la cinasa responsable de la fosforilación de Akt en la treonina 308) se encuentran inhibidos farmacológicamente no se observa fosforilación de YAP durante la infección (Fig.2C). Esto nos indica que *Salmonella* requiere de Akt para promover la fosforilación de YAP en linfocitos B infectados.



B



C



D

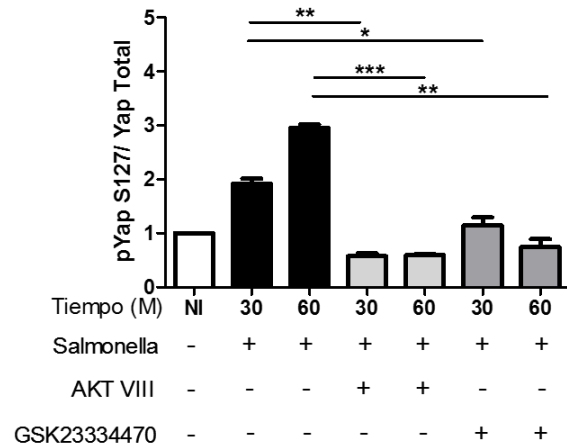
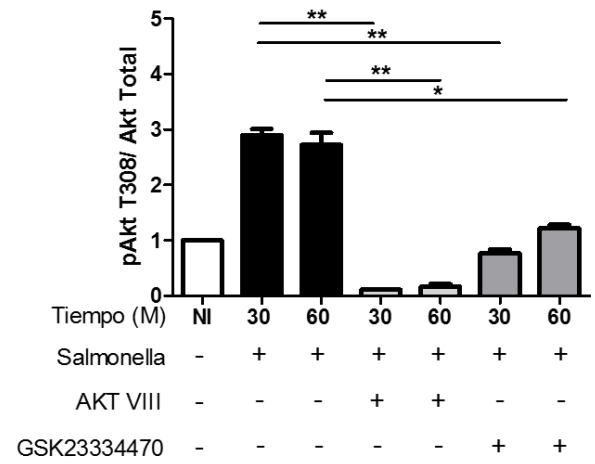


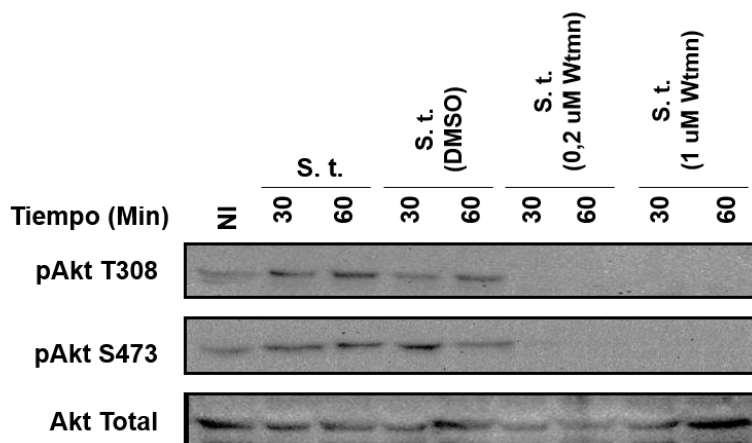
Figura 2.- Akt es responsable de la fosforilación de YAP en linfocitos B infectados por Salmonella. **A)** Linfocitos B fueron infectados a una MDI de 50 con *Salmonella typhimurium* WT o *Salmonella typhimurium* Δ sopB. A los tiempos indicados se extrajo proteína y los niveles de expresión de pYAP S127 se evaluaron por Western Blot. **B)** Densitometria de la figura A mostrando los niveles de expresión de la proteína pYAP S127 relativo a la expresión de YAP total y normalizado a la expresión del control (sin infectar). **C)** Linfocitos B pretratados con los inhibidores AKTVIII (2.12 μ M) o GSK23334470 (50 μ M) fueron infectados con *Salmonella* WT. A los tiempos indicados se extrajo proteína y los niveles de pAkt T308, pAkt S473 y pYAP S127 se evaluaron por Western Blot. **D)** Densitometria de la figura C mostrando los niveles de expresión de pAkt T308, pAkt S473 y pYAP S127 relativos a la expresión de Akt total o YAP total y normalizados al control (no infectado). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

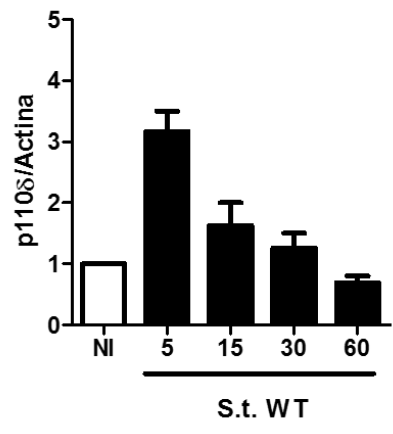
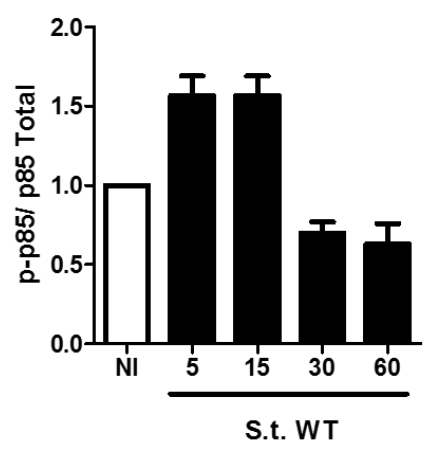
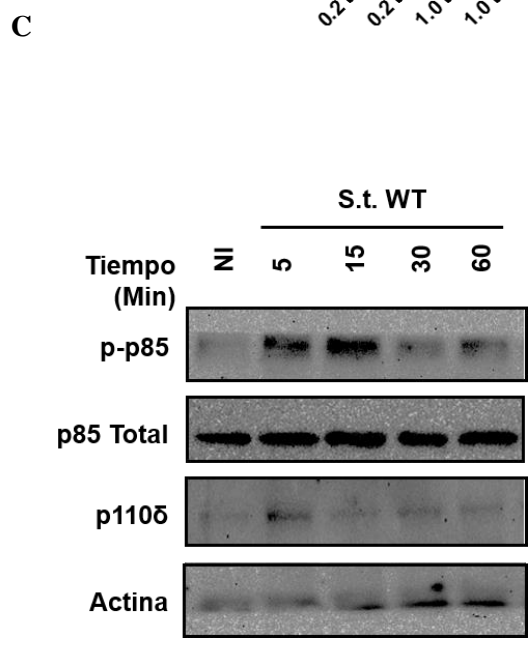
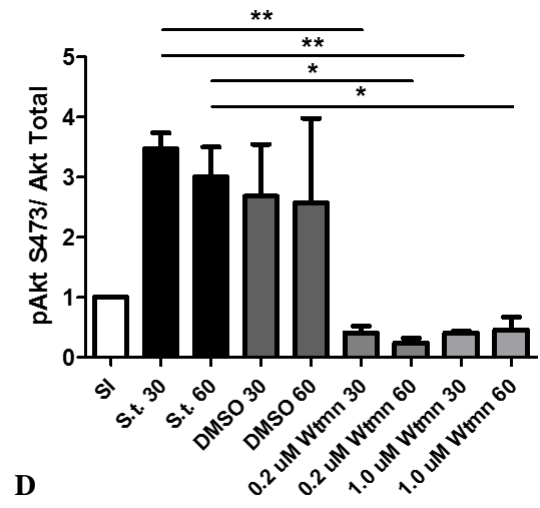
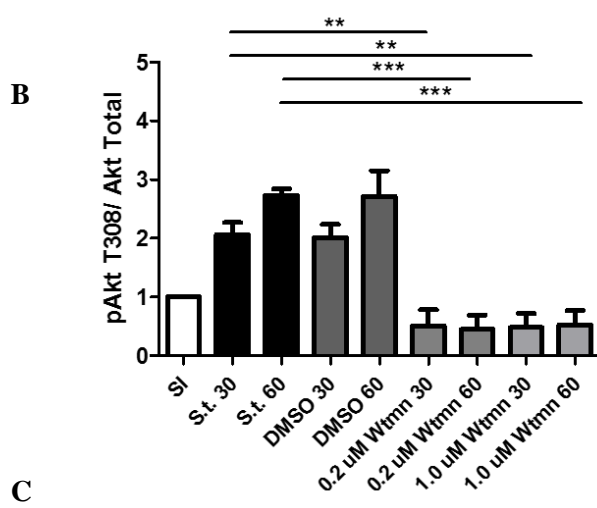
***Salmonella typhimurium* requiere de PI3K clase I para activar a Akt**

La activación de Akt de manera canónica requiere la producción de PIP3 por parte de cinasas de inositidos de la familia PI3K.³⁰ Se ha reportado que la activación de Akt por parte de SopB puede ser o no independiente de PI3K dependiendo de la célula hospedera infectada.⁵⁰ Por lo tanto era imperativo analizar si en el linfocito B *Salmonella* requiere de PI3K para activar a Akt. Para ello infectamos linfocitos B pretratados con el inhibidor farmacológico de PI3K wortmannina. Mediante western blot observamos que cuando PI3K se encuentra inhibido *Salmonella* es incapaz de promover la activación de Akt (Fig.3A) lo cual implica que *Salmonella* requiere de PI3K para activar a Akt.

Se ha propuesto que SopB es capaz de activar a PI3K a través de su actividad de fosfatasa de inositidos. SopB promueve la acumulación del inositido PIP1 el cual es sustrato de PI3K favoreciendo su activación.⁵⁴ Por lo tanto decidimos evaluar la dinámica de activación de PI3K en linfocitos B infectados con *Salmonella typhimurium*. PI3K de clase I en linfocitos B se encuentra mayoritariamente formado por el heterodimero p85-p110 δ , donde, p85 es la subunidad regulatoria y p110 δ la subunidad catalítica. Por western blot evaluamos la fosforilación de la subunidad p85 y la estabilización de la subunidad p110 δ durante la infección por *Salmonella* así como la producción de PIP3 por inmunofluorescencia. Durante la infección por *Salmonella* observamos una fosforilación temprana de la subunidad p85 (5-15 min.) y la estabilización de la subunidad p110 δ (5-15 min.) (Fig.3C). Además por inmunofluorescencia encontramos un incremento en la producción de PIP3 durante la infección con *Salmonella* (Fig.3E) lo cual correlaciona con la fosforilación de la subunidad p85 y la estabilización de la subunidad p110 δ . Por lo tanto *Salmonella* promueve la activación de Akt siguiendo una dinámica clásica de producción de PIP3.

A





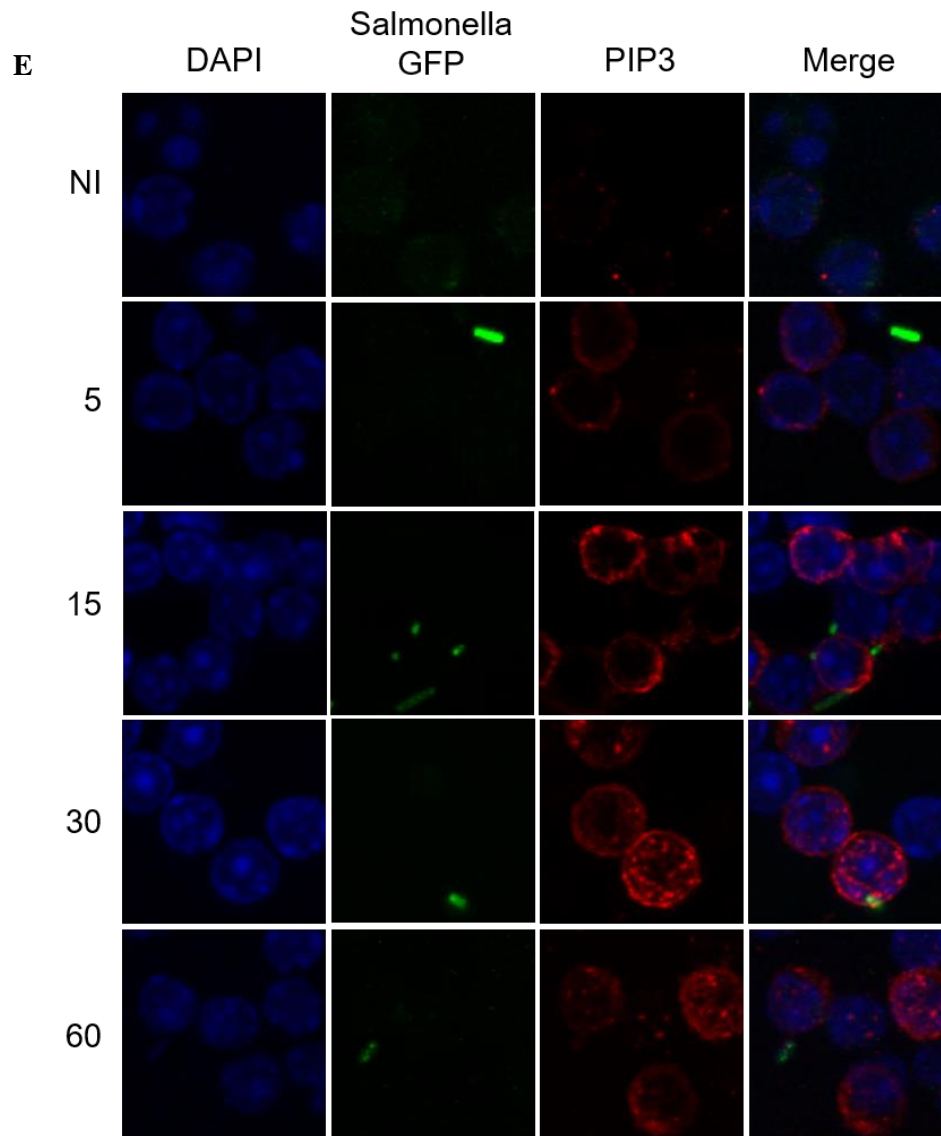
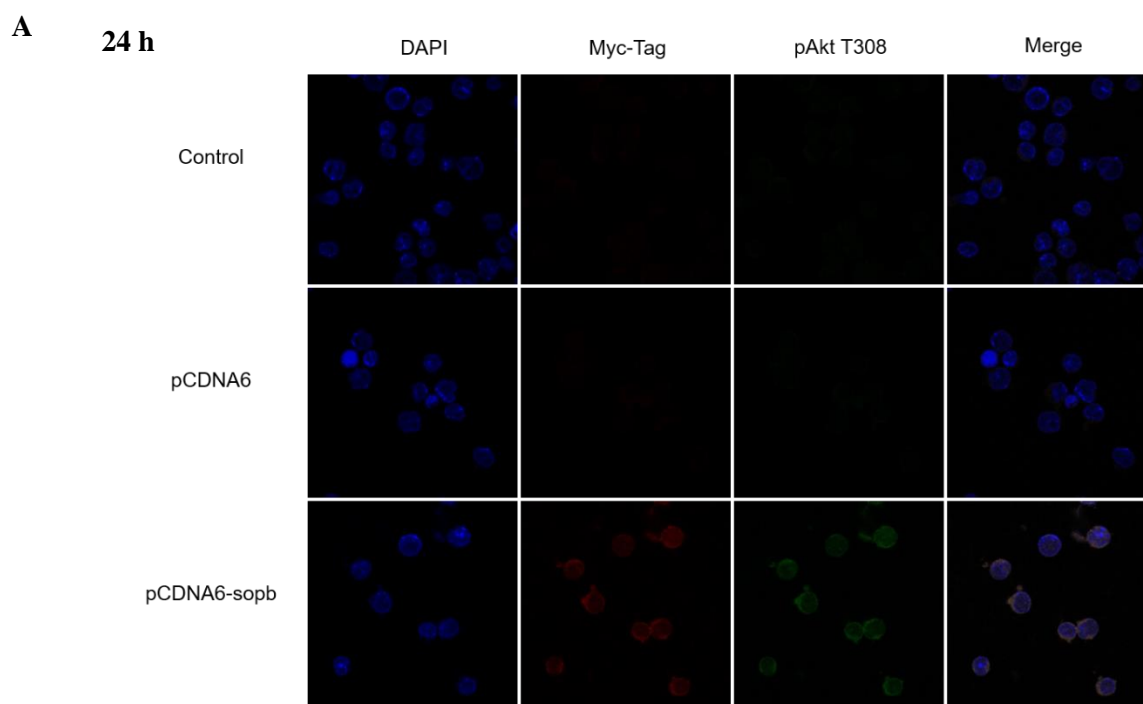


Figura 3. La activación de Akt por *Salmonella* es dependiente de PI3K clase I. A) Linfocitos B pretratados con Wortmannina (0.2 o 1 μ M) fueron infectados con *Salmonella typhimurium* a una MDI de 50. A los tiempos indicados se extrajo proteína y la expresión de pAkt T308 y pAkt S473 se evaluó por Western Blot. **B)** Niveles de expresión de pAkt T308 y pAkt S473 relativos a la expresión de Akt total y normalizados al control (Sin infectar). **C)** Linfocitos B fueron infectados con *Salmonella typhimurium* a una MDI de 50, a los tiempos indicados se extrajo proteína y la expresión de p-p85 Y458 y p110 δ se evaluó por Western Blot. **D)** Niveles de expresión de p-p85 Y458 y p110 δ relativos a p85 total y actina respectivamente y normalizados al control (Sin infectar). **E)** Linfocitos B fueron infectados como en C, a los tiempos indicados las células se fijaron y la expresión de PIP3 se evaluó por inmunofluorescencia. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

SopB es suficiente para la activación de la vía Akt-YAP en linfocitos B.

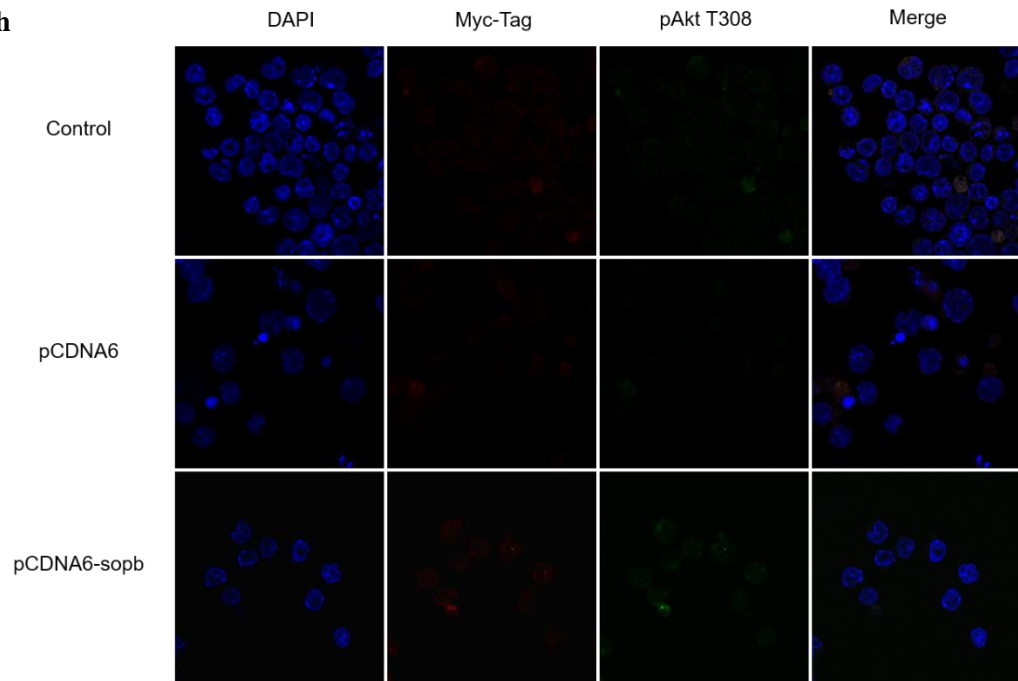
Una vez que habíamos establecido que *Salmonella* a través de SopB promueve la activación de la vía PI3K-Akt-YAP nos preguntamos si SopB era un factor suficiente para la activación de esta vía. Para responder esto contamos con el vector pCDNA6-*sopB* el cual tiene clonado el gen *sopB* de *Salmonella typhimurium* 14028. Linfocitos B de la línea celular A20 se transfectaron de forma transitoria y a las 24 y 48 horas post-transfección se evaluó por inmunofluorescencia la activación de la proteína Akt y la fosforilación de YAP.

24 horas post transfección observamos que Akt se encuentra principalmente fosforilado en la treonina 308 (Fig.4A) mientras que a las 24 horas el balance se inclina más hacia la fosforilación en la serina 473 (Fig.4D). YAP se encuentra fosforilado de manera importante desde las 24 horas (Fig.4E) y esta fosforilación se incrementa a las 48 horas (Fig.4F). Además, y como ya se ha reportado en la literatura, observamos a YAP fosforilado enriquecido en el citoplasma. Estos resultados nos muestran que SopB como proteína es suficiente para promover la activación de la vía Akt-YAP en linfocitos B.



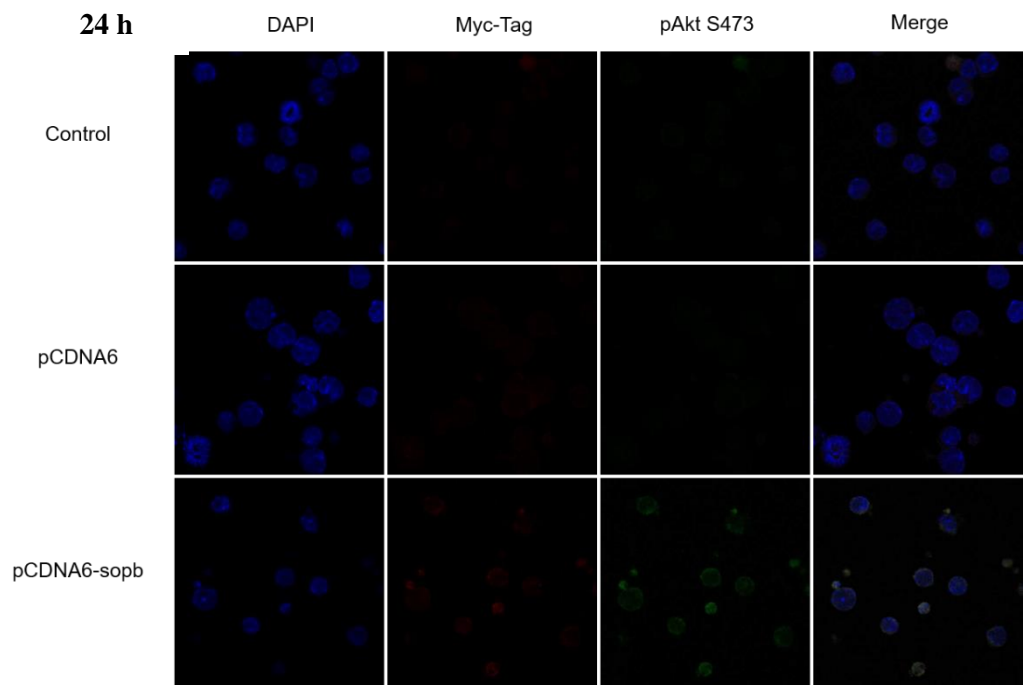
B

48 h

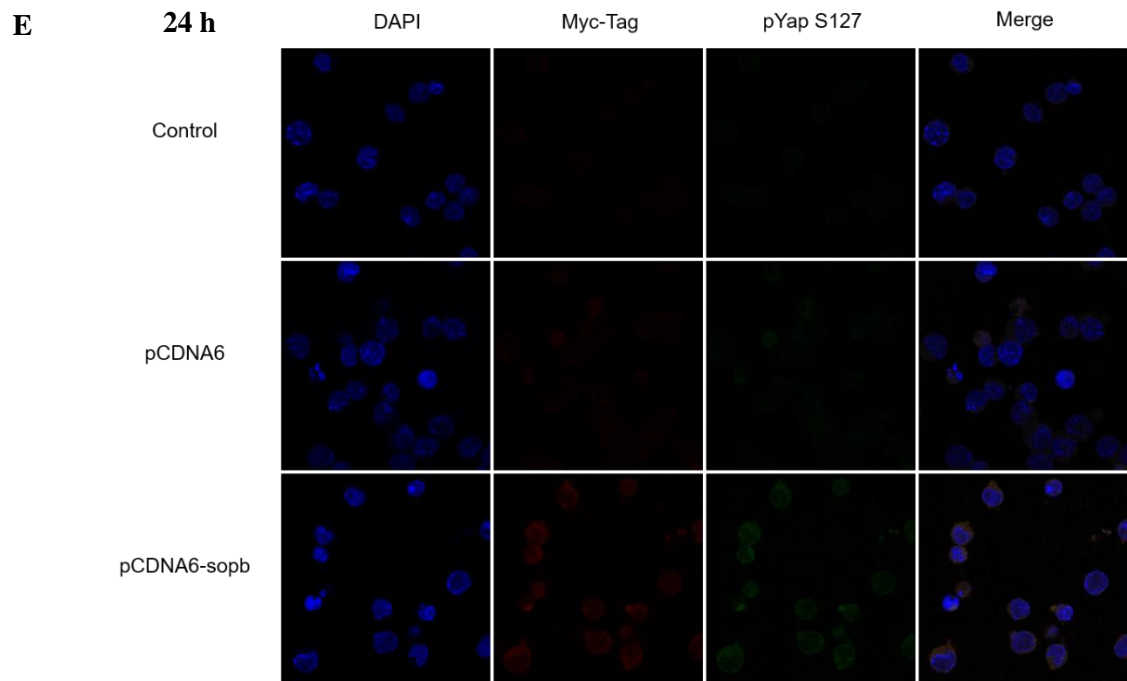
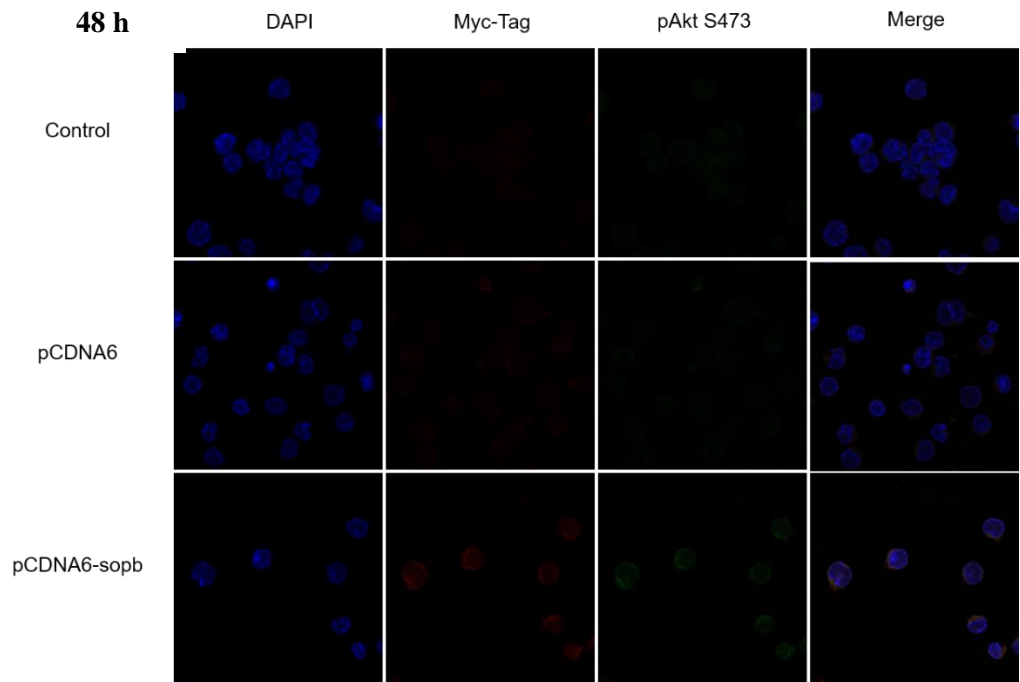


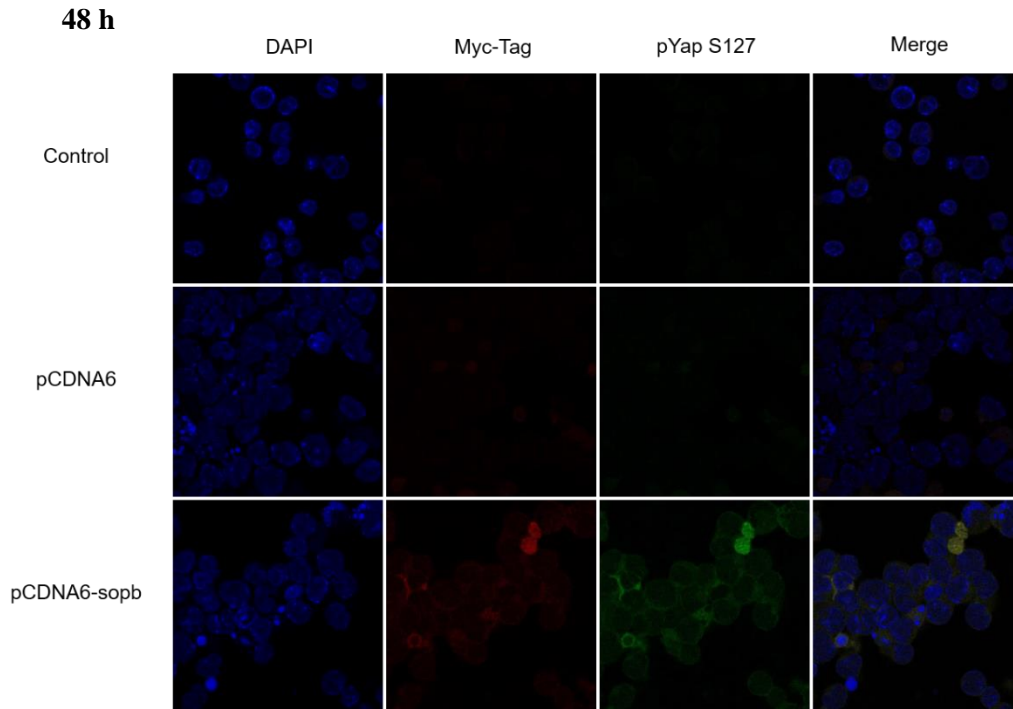
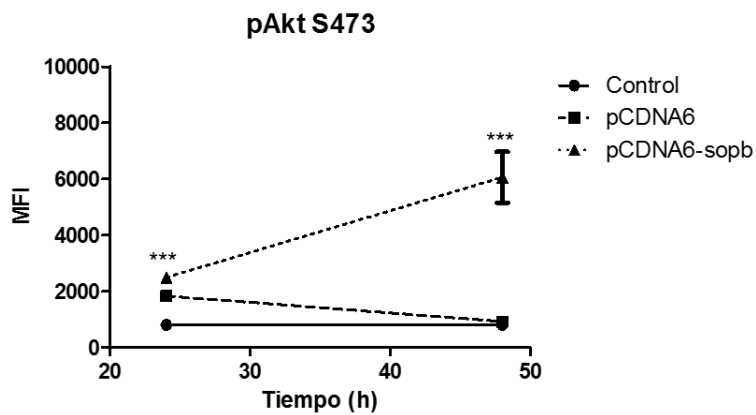
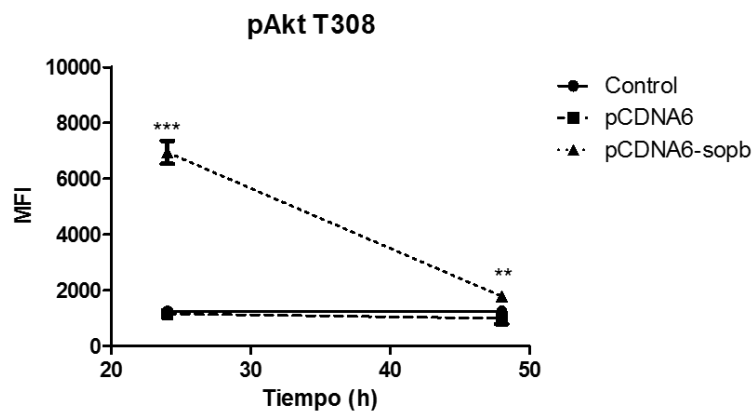
C

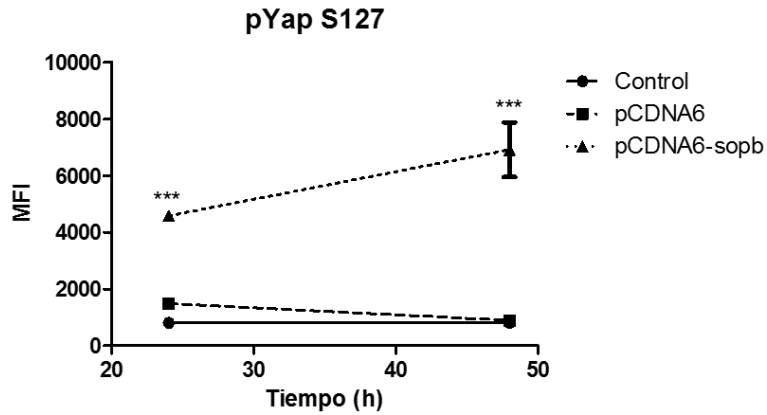
24 h



D



F**G**



H

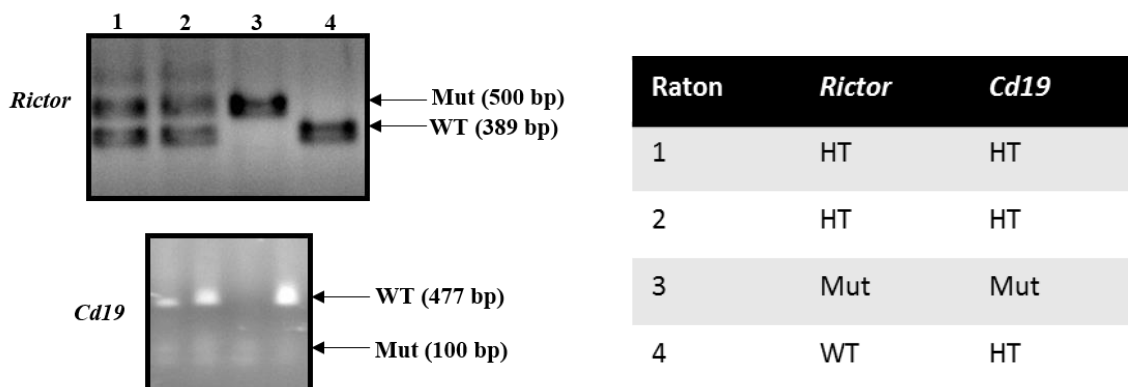
	24 H	48 H
-SopBMyC	Pearson's correlation coefficient (Rr)	Pearson's correlation coefficient (Rr)
pAkt S473	,5742	,5628
pAkt T308	,8702	,2726
pYap S127	,80775	,7056

Figura 4. SopB promueve la activación de la vía Akt-YAP. Células de la línea celular A20 fueron transfectadas con el plásmido pcDNA6-*sopB*. 24 y 48 post-infección se evaluaron por microscopía confocal los niveles de expresión de pAkt T308 (A,B), pAkt S473 (C,D) y pYAP S127 (E,F). G) Niveles de expresión de pAkt T308, pAkt S473 y pYAP S127 presentados como intensidad media de fluorescencia. H) Niveles de correlación entre SopB-Myc y pAkt T308, pAkt S473 y pYAP S127. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

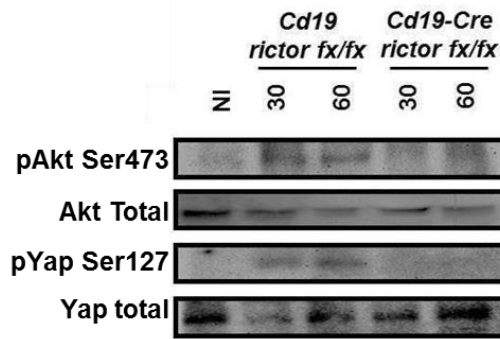
El complejo mTORC2 es indispensable para la activación de la vía Akt-YAP y la sobrevivida de *Salmonella* en linfocitos B.

El complejo mTORC2 es responsable de la fosforilación de Akt en la serina 473. Por esta razón decidimos analizar si este complejo se requiere para la activación de la vía Akt-YAP en linfocitos B infectados por *Salmonella*. Para ello generamos una cepa de ratón que carece del gen *Rictor* de manera específica en linfocitos B mediante el sistema de recombinación Cre-Lox (Fig.5A). *Rictor* es una proteína de andamiaje que se requiere para el correcto ensamblaje del complejo mTORC2, al carecer de esta proteína el complejo no se puede ensamblar. Analizamos la activación de Akt y la fosforilación de YAP en linfocitos B *Rictor*^{-/-} infectados con *Salmonella*. Mediante western blot observamos que *Salmonella* es incapaz de activar a Akt y fosforilar a YAP durante la infección cuando *Rictor* no está (Fig.5B). Al analizar si la deficiencia de *Rictor* tenía un impacto en la sobrevivida de *Salmonella* en el linfocito B encontramos que *Salmonella* es eficientemente controlada en linfocitos B que carecen del gen *Rictor* (Fig.5D) lo cual correlaciona con el resultado obtenido por western blot. Por lo tanto *Salmonella* requiere del complejo mTORC2 para activar la vía Akt-YAP y sobrevivir dentro del linfocito B.

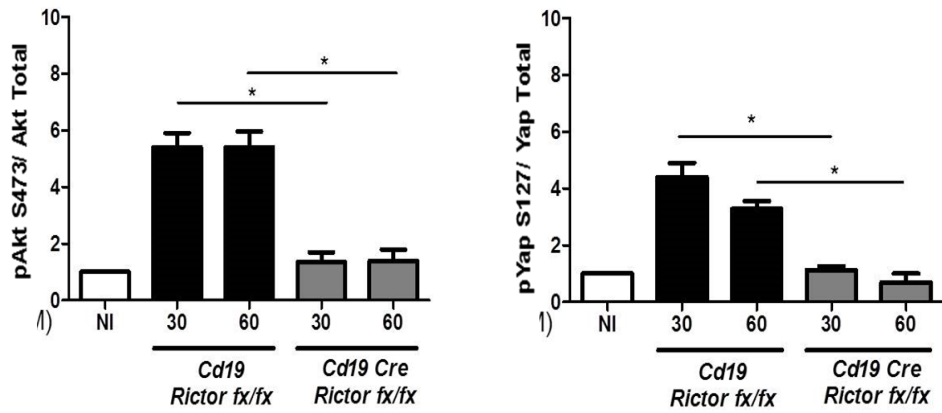
A



B



C



D

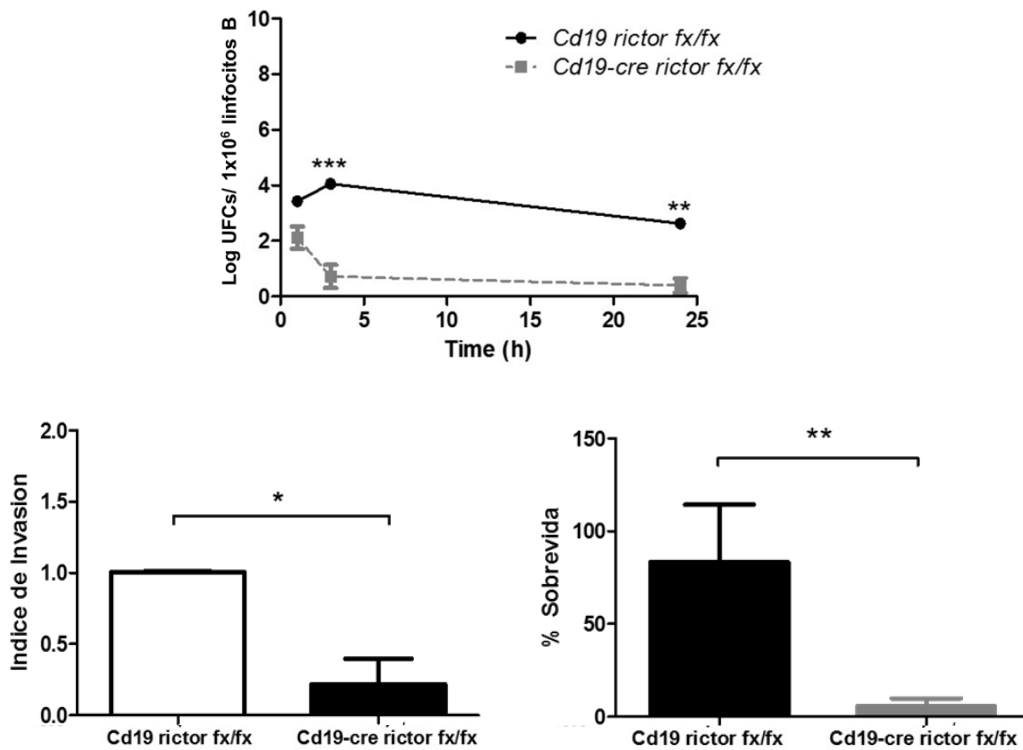
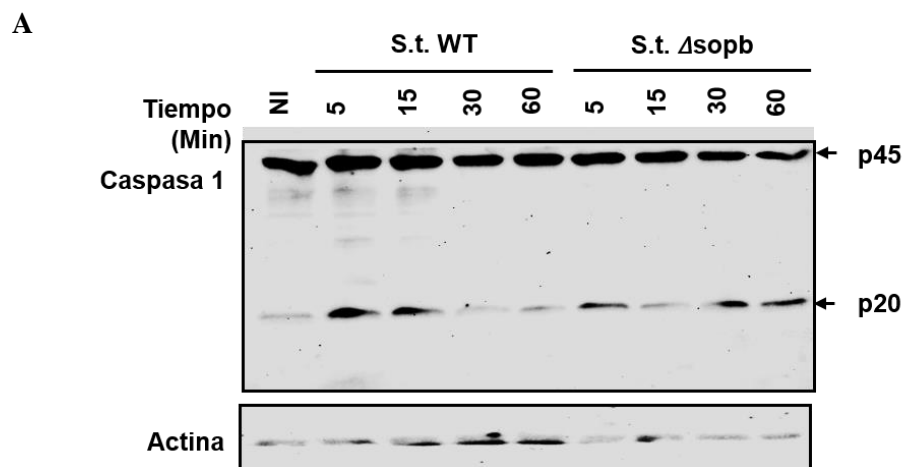


Figura 5. El complejo mTORC2 es indispensable para la activación de la vía Akt-Yap y la sobrevivencia de *Salmonella* en linfocitos B. **A)** Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR usando como templado ADN obtenido de la cola de cuatro ratones y usando cebadores dirigidos contra los genes *Cd19* y *Rictor*. **B)** Linfocitos B provenientes del ratón *Cd19^{tm1(cre)Cgn} Rictor^{tm1.1Klg}* (*Cd19Cre Rictor^{fx/fx}*) o STOCK *Rictor^{tm1.1Klg}/SjmJ* (*Cd19 Rictor^{fx/fx}*) fueron infectados con *Salmonella typhimurium* a una MDI de 50, a los tiempos indicados se extrajo proteína y los niveles de expresión de pAkt S473 y pYAP S127 se evaluaron por Western Blot. **C)** Densitometría de la figura B mostrando los niveles de expresión de las proteínas pAkt S473 y pYAP S127 relativos a la expresión de Akt total y YAP total respectivamente y normalizados a la expresión del control (sin infectar). **D)** Linfocitos B fueron infectados como en B, a las 1,3 y 24 horas post-infección las células se lisaron y plaquearon en LB agar para determinar el número de UFCs. El índice de invasión se calculó usando la siguiente fórmula (UFCs WT 1h/ UFCs *Rictor^{-/-}* 1h). El porcentaje de sobrevivencia se calculó usando la siguiente fórmula ((UFCs 24h/UFCs 1h) x100). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

SopB regula la activación de caspasa 1 y la secreción de citocinas en linfocitos B infectados.

Una vez que teníamos identificados los elementos bacterianos y celulares responsables de la fosforilación de YAP era necesario analizar la vía caspasa1-IL1 β la cual hemos reportados se ve afectada por la fosforilación de YAP. Para ello infectamos linfocitos B con *Salmonella typhimurium* WT o *Salmonella typhimurium* Δ sopB y analizamos el procesamiento de caspasa-1 y la secreción de IL-1 β . Encontramos que en linfocitos B infectados con la cepa WT si bien hay un procesamiento temprano de caspasa-1 (5-15 min.) este procesamiento no se observa en tiempos posteriores (30-60 min) mientras que en linfocitos B infectados con la cepa Δ sopB el procesamiento de caspasa-1 se mantiene durante la infección (Fig.6A). Al evaluar la secreción de IL-1 β en el sobrenadante de estos linfocitos infectados encontramos que *Salmonella* WT bloquea la secreción de IL-1 β mientras que en linfocitos B infectados con *Salmonella* Δ sopB la secreción de IL-1 β es significativamente mayor (Fig.6D). Caspasa-1 e IL-1 β se han relacionado directamente con la inducción de muerte por piroptosis, para analizar este proceso medimos la secreción de lactato deshidrogenasa en el sobrenadante de linfocitos infectados. El resultado mostro que la secreción de LDH es similar independientemente de si el linfocito B se infecta con la cepa WT o Δ sopB (Fig.6C). Además de IL-1 β medimos la secreción de IL-6 e IL-10, citocinas importantes en el balance inflamatorio del microambiente celular. Encontramos que los linfocitos infectados con *Salmonella* WT secretan menos IL-6 y más IL-10 que aquellos infectados con la cepa Δ sopB (Fig.6D). Por lo tanto *Salmonella* a través de SopB impide el procesamiento de caspasa-1 y la secreción de IL-1 β e IL-6 mientras que promueve la secreción de IL-10.



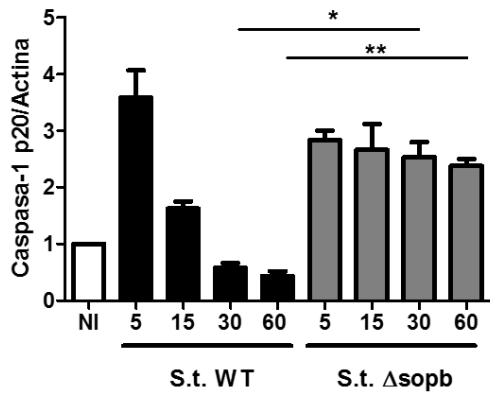
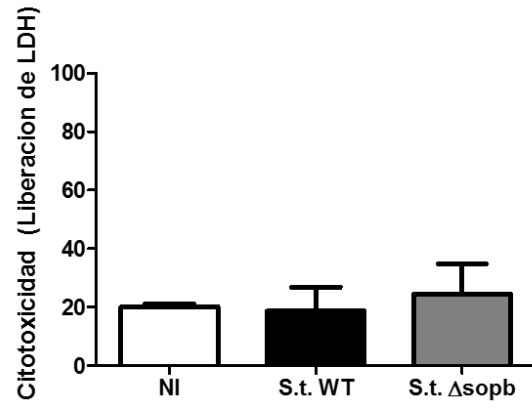
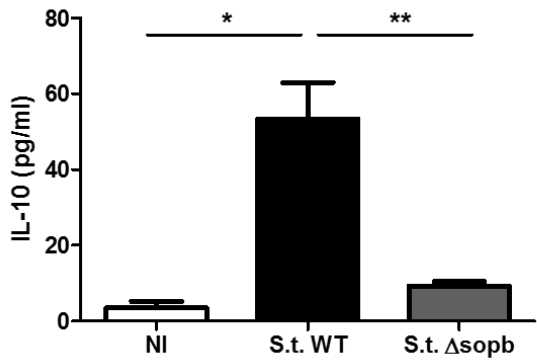
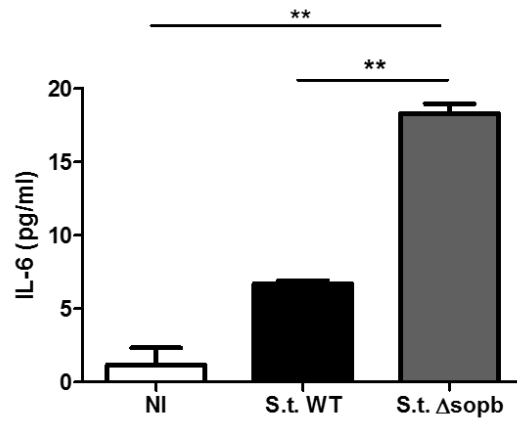
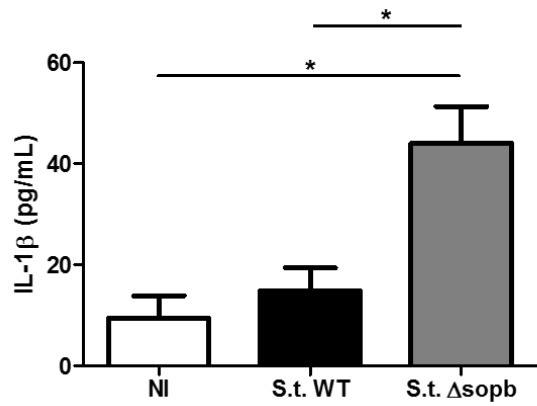
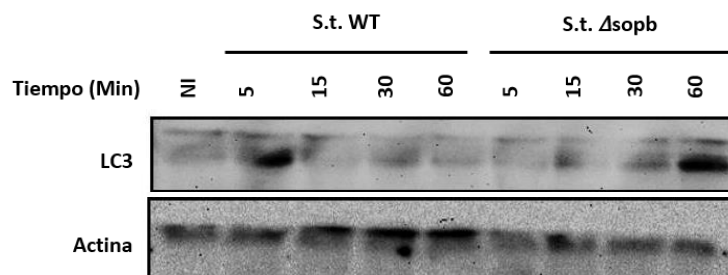
B**C****D**

Figura 6. SopB regula la activación sostenida de caspasa 1 y la secreción de citocinas en linfocitos B infectados. **A)** Linfocitos B fueron infectados con *Salmonella typhimurium* WT o *Salmonella typhimurium* Δ sopB a una MDI de 50. A los tiempos indicados se extrajo proteína y la expresión de la proteína Caspasa-1 se evaluó por Western Blot. **B)** Niveles de expresión del fragmento p20 de la proteína caspasa-1 relativos a la expresión de actina y normalizados a la expresión del control (sin infectar). **C)** Linfocitos B fueron infectados como en A, 24 horas post-transfección los sobrenadantes se recuperaron y se determinó la liberación de LDH. **D)** Linfocitos B fueron infectados como en A, 24 horas post-transfección los sobrenadantes se recuperaron y se determinó la concentración de IL-1 β , IL-6 e IL-10. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

***Salmonella* bloquea autofagia a través de la activación del complejo mTORC1 como mecanismo de sobrevivencia.**

La autofagia es un proceso catabólico responsable de la degradación autofagosómica y lisosomal de componentes citoplasmáticos. Una forma de autofagia denominada xenofagia se ha implicado en la degradación de bacterias intracelulares.⁵⁵ El eje PI3K-Akt, la proteína YAP y la citocina IL-10 se han reportado como reguladores del proceso de autofagia⁵⁶⁻⁶⁰ por lo que consideramos importante analizar si *Salmonella* a través de la activación de la vía Akt-YAP estaría bloqueando el proceso autofagocítico. Para ello infectamos linfocitos B con *Salmonella typhimurium* WT o *Salmonella typhimurium* Δ sopB y analizamos por western blot a tiempos tempranos la expresión de la proteína LC3 la cual está involucrada en el ensamblaje del autofagosoma.⁶¹ Como hipotetizamos, a tiempos tempranos, en linfocitos B infectados con *Salmonella typhimurium* Δ sopB observamos una acumulación y procesamiento a la proteína LC3 a los 60 minutos, mientras que con la cepa WT no observamos acumulación de LC3 (Fig.7A). Para corroborar si *Salmonella* es capaz de bloquear autofagia tratamos con rapamicina (un inductor de autofagia) antes o durante la infección con *Salmonella* WT y medimos por western blot la degradación de la proteína p62 involucrada en el ensamblaje del autofagosoma y en el transporte de proteínas marcadas para degradación por autofagia. Independientemente de si la rapamicina se añade antes o durante la infección *Salmonella* bloquea la degradación de la proteína p62 (Fig.7C).⁶² Esto nos indica que *Salmonella* bloquea la autofagia a través del efector SopB.

A



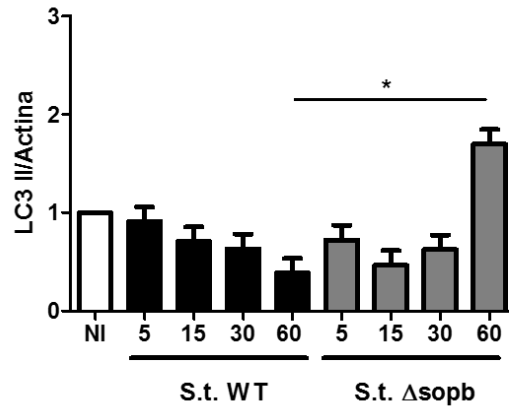
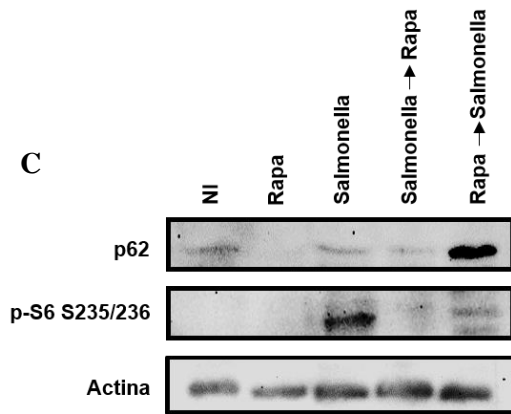
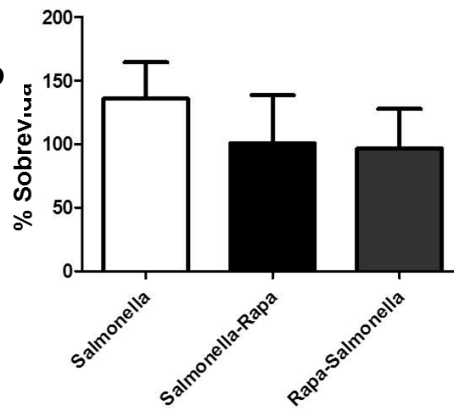
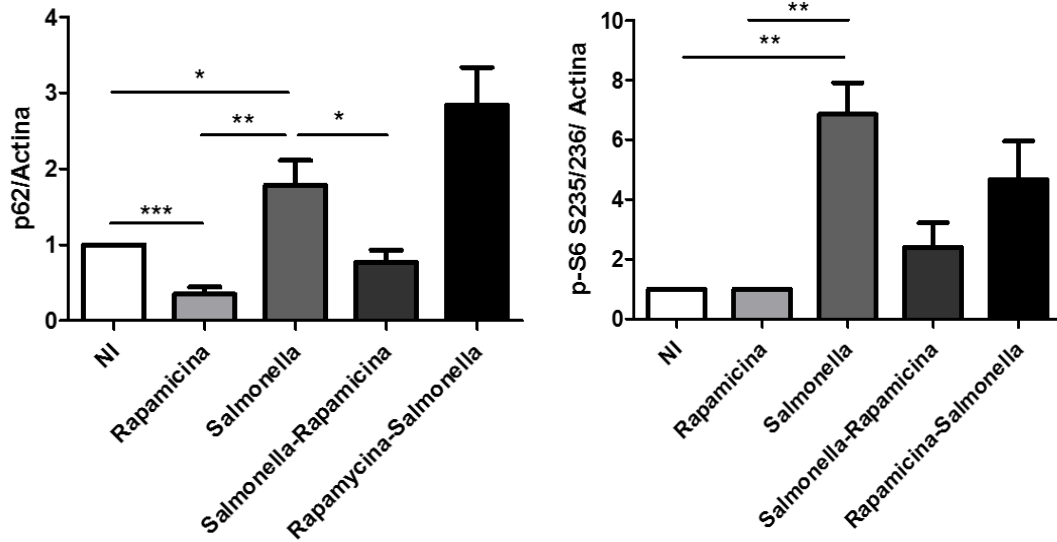
B**C****D****F**

Figura 7. Salmonella bloquea autofagia como mecanismo de sobrevivencia. **A)** Linfocitos B fueron infectados con *Salmonella typhimurium* WT o *Salmonella typhimurium* Δ sopB a una MDI de 50. A los tiempos indicados se extrajo proteína y la expresión de la proteína LC3B se evaluó por Western Blot. **B)** Densitometría de la figura A mostrando los niveles de expresión de la proteína LC3B II relativos a la expresión de actina y normalizados a la expresión del control (sin infectar). **C)** Linfocitos B se infectaron con *S.t.* WT a una MDI de 50 por 3 horas, en la última hora se agregó rapamicina (100 nM) al medio, y linfocitos B se pretrataron con rapamicina (100 nM) por una hora y después se infectaron con *S.t.* WT a una MDI de 50 por tres horas. Al tiempo indicado post-infección se extrajo proteína y los niveles de expresión de las proteínas p62 y pS6 S235/236 se evaluaron por Western Blot. **D)** Linfocitos B se infectaron como en C, 1 y 3 horas post infección las células se lisaron con una solución de PBS-Triton X100 y diluciones se plaquearon en agar LB para determinar el número de UFCs. El porcentaje de sobrevivencia se calculó usando la siguiente fórmula ((UFCs 3h/UFCs 1h)x100). **E)** Niveles de expresión de la proteína p62 relativos a la expresión de actina y normalizados a la expresión del control (sin infectar). **F)** Densitometría de la figura C mostrando los niveles de expresión de la proteína pS6 S235/236 relativos a la expresión de actina y normalizados a la expresión del control (sin infectar). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Discusión

SopB es una fosfatasa de inositidos que tiene un papel importante en la invasión celular y enteropatogénesis durante la infección por *Salmonella*. Además, protege a las células epiteliales de la muerte por apoptosis a través de la activación de la cinasa Akt.^{8, 19, 46, 48, 63} Se ha reportado que en células epiteliales, SopB a través de su actividad de fosfatasa de inositidos promueve la acumulación de PI(3,4)P2/PI(3,4,5)P3 en la membrana celular, lo cual conlleva al reclutamiento de Akt y su activación por PDK1 y mTORC2. En este estudio demostramos que durante la infección por *Salmonella* en linfocitos B primarios SopB promueve la acumulación membranal de PI(3,4,5)P3 en un proceso que requiere de PI3K de clase I. Al igual que en células epiteliales, Akt requiere de PDK1 y mTORC2 para su activación y en este trabajo mostramos que cuando Akt está completamente activado fosforila a la proteína YAP. Una vez que YAP es fosforilada es retenida en el citoplasma lo que conllevaría a una disminución en la transcripción del gen *Nlrc4* y por lo tanto a una reducción en la secreción de IL-1 β . Sin embargo, es altamente probable que otros procesos celulares se vean afectados dado que, como coactivador, YAP juega un papel importante en procesos como apoptosis, autofagia y síntesis de microRNAs.^{58, 59, 64}

Hasta un 30% de los eventos de fosforilación durante la infección por *Salmonella* han sido directamente ligados a SopB, la modulación de estos fenómenos de fosforilación es clave para promover la sobrevivencia de *Salmonella* y de la célula hospedera.^{49, 65, 66} Sin embargo, no había sido previamente demostrado que SopB, a través de Akt promueve la fosforilación de Yap durante la infección por *Salmonella*. El papel de Akt como la cinasa responsable de la fosforilación de YAP se apoya en el hecho de que la fosforilación de YAP se encuentra disminuida en presencia de inhibidores de Akt, PDK1 o cuando el gen *Rictor* es eliminado.

El bloqueo en la producción de IL-1 β fue reportado primero por Perez-Lopez.⁴⁴ En este estudio nosotros reportamos que el efector bacteriano SopB es el responsable de este fenómeno. La secreción de IL-1 β y la muerte celular por piroptosis son eventos ligados dado que ambos procesos se encuentran río abajo de la activación de caspasa-1.⁶⁷ En linfocitos B infectados con *Salmonella typhimurium* Δ sopB observamos que la secreción de IL-1 β se reestablece, sin embargo estas células no mueren por piroptosis. Un fenómeno similar se ha observado en neutrófilos infectados con *Salmonella*. Estas células secretan IL-1 β vía activación del inflamosoma NLRC4 sin sufrir piroptosis.⁶⁸ Estos resultados apoyan la idea de que la piroptosis es un mecanismo independiente de citocinas. En este contexto, Gasdermina D ha emergido recientemente como un elemento importante en la inducción de piroptosis.

Esta proteína autoregulada es responsable de la muerte por piroptosis y es solo activa cuando es procesada por caspasa-1 o caspasa-11.^{69, 70} Durante la infección por *Salmonella* Gasdermina D no sería procesada dado que hay una disminución en la expresión de NLRC4 lo que impide el procesamiento de caspasa-1. Sin embargo la muerte por piroptosis no se observa en linfocitos B infectados con *Salmonella typhimurium* Δ sopB, lo que sugiere que la señalización celular a través de Akt juega un papel importante en la modulación de la piroptosis en linfocitos B.

La xenofagia es un proceso celular que elimina patógenos intracelulares.⁵⁵ En células epiteliales, los receptores de xenofagia NDP52 y p62 marcan *Salmonella* que ha sido ubiquitinada y la VCS dañada y decorada con Galectina-8. En el primer caso, *Salmonella* es eliminada mientras que en el segundo, la vacuola puede ser marcada para degradación y control de la infección o, de manera importante, puede reclutar a la maquinaria de reparación membranar lo que conlleva a la sobrevivencia de la bacteria.^{62, 71-73} Esto sugiere que la interacción entre *Salmonella*, la VCS y la maquinaria de xenofagia es un proceso altamente dinámico de detección y evasión. Además, la infección por *Salmonella* induce la agregación de endomembranas de la célula hospedera, las cuales son digeridas junto con las VCS adyacentes de manera ubiquitin-independientes en un fenómeno conocido como agrefagia.⁷⁴ Nosotros mostramos que en linfocitos B infectados *Salmonella* bloquea la xenofagia a través de SopB. *Salmonella* a través de la activación de la vía PI3K-Akt promueve la activación de mTORC1 el cual regula de manera negativa los procesos xenofágicos y favorece la sobrevivencia de la bacteria. Además, IL-10 a través de la señalización de IL-10R amplificaría la señalización de la vía PI3K-Akt-mTORC1.⁵⁷ Ha sido reportado que los linfocitos B producen IL-10 en respuesta a la infección por *Salmonella*.⁷⁵ IL-10 es una citocina anti-inflamatoria que reduce la capacidad microbicida de los macrófagos y regula la presentación de antígenos vía MHC-II.⁷⁶ Por otro lado, SopB es capaz de reclutar y activar a TRAF6, una ubiquitin-ligasa responsable de la ubiquitinación de STAT3.⁷⁷ Esta modificación post-traduccionar favorece la fosforilación y activación de STAT3. STAT3 es un factor de transcripción necesario para la producción de IL-10 en macrófagos, por lo tanto, es posible que SopB-TRAF6 participen en la producción de IL-10 en linfocitos B infectados con *Salmonella*. De esta manera, hay un proceso de amplificación que contribuye a evitar el control bacteriano.

YAP también ha sido implicada en la regulación de la autofagia ya que, como coactivador transcripcional, YAP controla un programa genético que lleva a la expresión de proteínas que participan en la degradación autofagosomal.^{58, 59} En linfocitos B, *Salmonella*

reside en vacuolas con características endo-lisomales sin ser degradada.⁴² Es posible, que *Salmonella* no sea degradada por una deficiencia en proteínas responsables de la degradación autofagosomal-lisosomal que requieren a YAP para ser eficientemente transcritas. Estos blancos genéticos de YAP son aún desconocidos. La no degradación lisosomal de *Salmonella* en linfocitos B correlaciona con estas células siendo incapaces de usar la vía vacuolar como mecanismo alternativo de procesamiento de antígenos para cargar péptidos de *Salmonella* en moléculas del MHC-I.

En resumen, en este estudio demostramos que en linfocitos B primarios infectados con *Salmonella* SopB lleva a la activación de la vía PI3K-Akt-YAP. Este fenómeno regula la producción de citocinas para promover un microambiente anti-inflamatorio y regular de manera negativa la xenofagia. Nuestros resultados apoyan la idea de que *Salmonella* activa vías que generan un nicho intracelular amigable para su replicación y sobrevivencia.

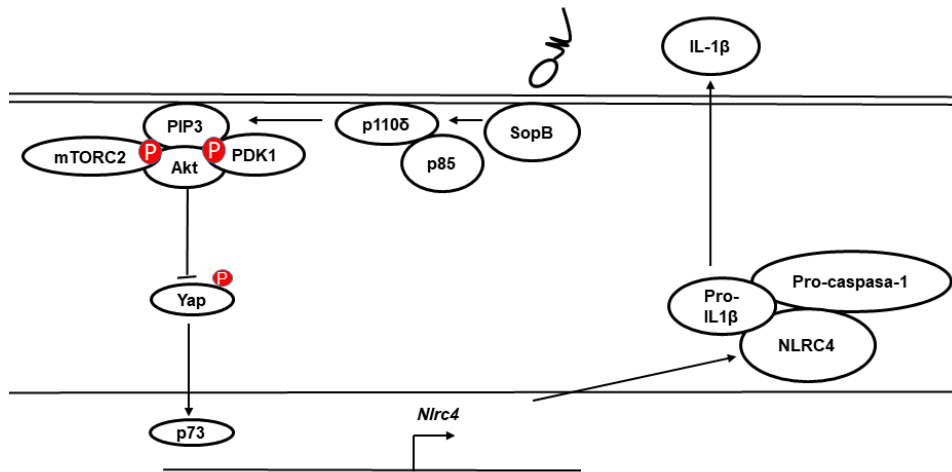


Fig.8 *Salmonella* a través de SopB activa la vía Akt-YAP para regular la secreción de IL-1β. A través de la activación de la vía Akt-YAP *Salmonella* promueve el secuestro de YAP en el citoplasma disminuyendo así la transcripción del gen *Nlrc4*. NLRC4 es requerido para el procesamiento de Caspasa-1 y la secreción de IL-1β. De esta manera *Salmonella* promueve un ambiente anti-inflamatorio que favorece su supervivencia dentro del linfocito B.

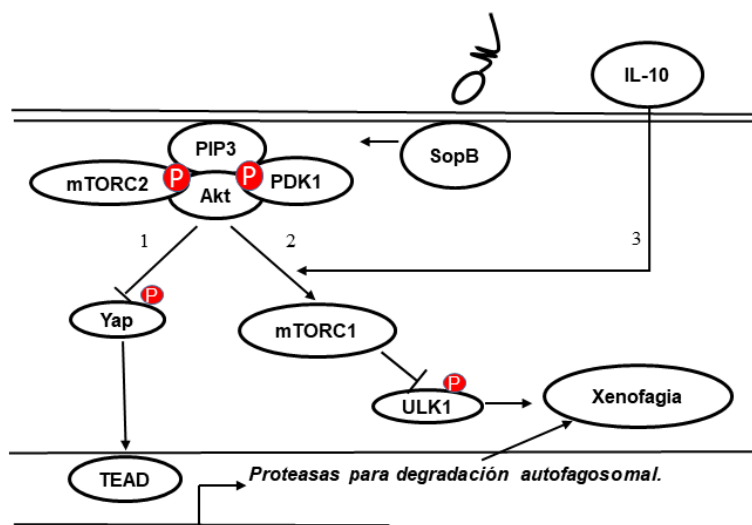


Fig.9 *Salmonella* a través de SopB estaría regulando vías de señalización que favorecen su supervivencia dentro del linfocito B. 1) A través de la activación de la vía Akt-YAP *Salmonella* promueve el secuestro de YAP en citoplasma disminuyendo así la transcripción de sus genes blancos como *Nlrc4* y proteasas necesarias para la secreción de citocinas y la degradación autofagosomal respectivamente. 2) A través de la activación de la vía PI3K-Akt-mTORC1 *Salmonella* regula negativamente la xenofagia. 3) A través de la secreción de IL-10 *Salmonella* promueve un ambiente anti-inflamatorio y regula negativamente la xenofagia amplificando la vía Akt-mTORC1.

Conclusión

Salmonella a través de SopB activa vías de señalización como Akt-YAP que promueven un ambiente anti-inflamatorio y evitan el control bacteriano.

Perspectivas

Analizar en linfocitos B el papel del complejo mTORC1 en la infección por *Salmonella*.

Evaluar las características de la vacuola que contiene a *Salmonella* en el linfocito B.

Evaluar potenciales blancos transcripcionales de YAP que participan en la degradación autofagosomal.

Evaluar el mecanismo mediante el cual *Salmonella* promueve la secreción de IL-10.

Referencias

1. Sandra L. Marcus, J.H.B., Cheryl G. Pfeifer, B. Brett Finlay, *Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages*. Microbes and Infection, 2000: p. 145-156.
2. Baumlér A, F.F., *Host specificity of bacterial pathogens*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013. **3**(12): p. a010041.
3. Crump JA, M.E., *Global trends in typhoid and paratyphoid Fever*. Clin Infect Dis, 2010. **50**(2): p. 241-6.
4. Hensel M, H.A., Nikolaus T, Sawers G, Berks BC., *The genetic basis of tetrathionate respiration in Salmonella typhimurium*. Molecular microbiology, 1999. **32**(2): p. 275-287.
5. Judith Behnsen, S.J., Christina P. Wong, Robert A. Edwards, Michael D. George, Wenjun Ouyang, Manuela Raffatellu, *The cytokine IL-22 promotes pathogen colonization by suppressing related commensal bacteria*. Immunity, 2014. **40**(2): p. 262–273.
6. Haraga A, O.M., Miller SI., *Salmonellae interplay with host cells*. Nat Rev Micro, 2008. **6**(1): p. 53-66.
7. Amin Tahoun, S.M., Edith Paxton, Georg Malterer, David S. Donaldson, Dai Wang, Alwyn Tan, Trudi L. Gillespie, Marie O'Shea, Andrew J. Roe, Darren J. Shaw, David L. Gally, Andreas Lengeling, Neil A. Mabbott, Jürgen Haas, Arvind Mahajan, *Salmonella Transforms Follicle-Associated Epithelial Cells into M Cells to Promote Intestinal Invasion*. Cell Host & Microbe, 2012. **12**: p. 645-656.
8. Zhou D, C.L., Hernandez L, Shears SB, Galan JE, *A Salmonella inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization*. Molecular Microbiology, 2001: p. 248-259.
9. Maria Rescigno, M.U., Barbara Valzasina, Maura Francolini, Gianluca Rotta, Roberto Bonasio, Francesca Granucci, Jean-Pierre Kraehenbuhl, Paola Ricciardi-Castagnoli, *Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria*. Nature Immunology, 2001. **2**: p. 361-367.
10. Gonzalez-Escobedo G, G.J., *Gallbladder Epithelium as a Niche for Chronic Salmonella Carriage*. Infection and immunity, 2013. **81**: p. 2920–2930.
11. David Hersh, D.M.M., Mark R. Smith, Nafisa Ghori, Stanley Falkow, Arturo Zychlinsky, *The Salmonella invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1*. Proc. Natl. Acad. Sci., 1999. **96**: p. 2396-2401.
12. Molly A. Brennan, B.T.C., *Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis*. Molecular Microbiology, 2000. **38**: p. 31-40.

13. Sophie Helaine, A.M.C., Kathryn G. Watson, Laura M. Faure, Sophie A. Matthews, David W. Holden, *Internalization of Salmonella by Macrophages Induces Formation of Nonreplicating Persisters*. Science, 2014. **343**: p. 204-208.
14. Ong, S.Y., et al., *Analysis and construction of pathogenicity island regulatory pathways in Salmonella enterica serovar Typhi*. J Integr Bioinform, 2010. **7**(1).
15. de Jong HK, P.C., van der Poll T, Wiersinga WJ., *Host-Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis*. Plos pathogens, 2012. **8**(10): p. 1-9.
16. Carmen M. Collazo, J.E.G., *The invasion-associated type-III protein secretion system in Salmonella – a review*. Gene, 1997. **192**: p. 51–59.
17. Michael Hensen, J.E.S., Barbel Raupach, Denise Monack, Stanley Falkow, Colin Gleeson, Toru Kubo, David W. Holden, *Functional analysis of ssaJ and the ssaK/U operon, 13 genes encoding components of the type II secretion apparatus of Salmonella pathogenicity island 2*. Molecular Microbiology, 1997. **24**: p. 155-167.
18. Edouard E. Galyov, M.W.W., Roland Rosqvist, Paul B. Mullan, Patricia R. Watson, Samantha Hedges, Tim S. Wallis, *A secreted effector protein of Salmonella dublin is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa*. Molecular Microbiology, 1997. **25**: p. 903-912.
19. Norris FA, W.M., Wallis TS, Galyov EE, Majerus PW., *SopB, a protein required for virulence of Salmonella dublin, is an inositol phosphate phosphatase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(24): p. 14057-9.
20. Beth A. McCormick, S.P.C., Charlene Delp-Archer, Samuel I. Miller, James L. Madara, *Salmonella typhimurium attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils*. Journal of cell biology, 1993. **123**: p. 895-907.
21. C. V. Srikanth, R.M.-L., Kelly Hallstrom, Beth A. McCormick, *Salmonella effector proteins and host cell responses*. Cellular and molecular life sciences, 2011: p. 3687-3697.
22. Jason S. Damiano, C.S., Frederick Pio, Adam Godzik, John C. Reed, *CLAN, a Novel Human CED-4-like Gene*. genomics, 2001. **75**.
23. Miao EA, R.J., *Salmonella and Caspase-1: A complex Interplay of Detection and Evasion*. Front Microbiol, 2011. **2**: p. 85.
24. Jean-Luc Poyet, S.M.S., Mehdi Tnani, Marjaneh Razmara, Teresa Fernandes-Alnemri, Emad S. Alnemri, *Identification of Ipaf, a human Caspase-1-activating protein related to Apaf-1*. Journal of biological chemistry, 2001. **276**(July 27).
25. Subhashini S, S.G., Vegesna R, Kiran B, Tapas KK, Ghanshyam S., *Caspase-1 activator Ipaf is a p53-inducible gene involved in apoptosis*. Oncogene, 2005. **24**: p. 627-636.

26. Strano S, M.E., Rossi M, Castagnoli L, Shaul Y, Sacchi A, Oren M, Sudol M, Cesareni G, Blandino G., *Physical interaction with Yes-associated protein enhances p73 transcriptional activity.* J Biol Chem, 2001. **276**(18): p. 15164-73.
27. Strano S, M.O., Pediconi N, Baccarini A, Fontemaggi G, Lapi E, Mantovani F, Damalas A, Citro G, Sacchi A, Del Sal G, Levrero M, Blandino G. , *The transcriptional coactivator Yes-Associated protein drives p73 gene-target specificity in response to DNA damage.* Molecular Cell, 2005. **18**: p. 447-459.
28. V. Tomlinson, K.G., P. Luong, K-Y Leung, A. Knebel, S. Basu, *JNK phosphorylates Yes-associated protein (YAP) to regulate apoptosis.* Cell death and disease, 2010.
29. Staal SP, H.J., Rowe WP., *Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(7): p. 3065-7.
30. TF, F., *PI3K/Akt: getting it right matters.* Oncogene, 2008. **27**: p. 6473–6488.
31. Vadas O, B.J., Zhang X, Berndt A, Williams RL., *Structural basis for activation and inhibition of class I phosphoinositide 3-kinases.* Sci Signal, 2011. **4**(195): p. re2.
32. Alessi DR, J.S., Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P., *Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha.* Curr Biol, 1997. **7**(4): p. 261-9.
33. Sarbassov DD, G.D., Ali SM, Sabatini DM., *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex.* Science, 2005. **307**(5712): p. 1098-101.
34. Limon JJ, F.D., *Akt and mTOR in B Cell Activation and Differentiation.* Front Immunol, 2012. **3**: p. 228.
35. LeBien TW, T.T., *B lymphocytes: how they develop and function.* Blood, 2008. **112**(5): p. 1570-80.
36. Shiv Pillai, A.C., *The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision.* Nature, 2009. **9**: p. 767-777.
37. Anna Brown, C.E.H., *The antibody response to salmonellae in mice and humans studied by immunoblots and ELISA.* Microbial Pathogenesis, 1989. **6**: p. 445-454.
38. Eleanor S. Metcalf, M.G., Lise Weisman Duran, *The diversity of the secondary Salmonella typhimurium-specific B cell repertoire.* Journal of immunology, 1987. **138**: p. 3461-3467.
39. Vianney Ortiz, A.I., Ethel Garcia-Ortigoza, Jesus Kumate, *Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer membrane proteins isolated from Salmonella typhi in humans with typhoid fever.* Journal of clinical microbiology, 1989. **27**.
40. Verjans GM, R.J., van Alphen L, Feltkamp TE, Kusters JG., *Entrance and survival of Salmonella typhimurium and Yersinia enterocolitica within human B- and T-cell lines.* Infect Immun, 1994. **62**(6): p. 2229-35.

41. Rosales-Reyes R, P.-L.A., Sánchez-Gómez C, Hernández-Mote RR, Castro-Eguiluz D, Ortiz-Navarrete V, Alpuche-Aranda CM., *Salmonella* infects B cells by macropinocytosis and formation of spacious phagosomes but does not induce pyroptosis in favor of its survival. *Microbial Pathogenesis*, 2012. **52**(6): p. 367–374.
42. Rosales-Reyes R, A.-A.C., Ramirez-Aguilar ML, Castro-Eguiluz AD, 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*. *Infection and immunity*, 2005: p. 3937-3944.
43. Castro-Eguiluz D, P.R., Rosales-Garcia V, Rosales-Reyes R, Alpuche-Aranda C, Ortiz-Navarrete V., *B cell precursors are targets for Salmonella infection*. *Microb Pathog*, 2009. **47**(1): p. 52-6.
44. Perez-Lopez A, R.-R.R., Alpuche-Aranda CM, 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. *J Immunol*, 2013. **190**(3): p. 1201-9.
45. Burkinshaw BJ, P.G., Worrall LJ, Strynadka NC., *Structure of Salmonella effector protein SopB N-terminal domain in complex with host Rho GTPase Cdc42*. *Journal of biological chemistry*, 2012. **287**(16): p. 13348-13355.
46. Raffatellu M, W.R., Chessa D, Andrews-Polymenis H, Tran QT, Lawhon S, Khare S, Adams LG, Baumler AJ., *SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 contribute to Salmonella enterica serotype typhimurium invasion of epithelial cells*. *Infect Immun*, 2005. **73**(1): p. 146-54.
47. Cooper KG, W.S., Malik-Kale P, Jolly C, Ireland R, Knodler LA, Steele-Mortimer O., *Activation of Akt by the bacterial inositol phosphatase, SopB, is wortmannin insensitive*. *Plos One*, 2011. **6**(7).
48. Knodler LA, F.B., Steele-Mortimer O., *The Salmonella effector protein SopB protects epithelial cells from apoptosis by sustained activation of Akt*. *Journal of biological chemistry*, 2005. **280**(11): p. 9058-9064.
49. Kuijl C, S.N., Marsman M, Tuin AW, Janssen L, Egan DA, Ketema M, van den Nieuwendijk R, van den Eeden SJF, Geluk A, Poot A, van der Marel G, Beijersbergen RL, Overkleeft H, Ottenhoff THM, Neefjes J., *Intracellular bacterial growth is controlled by a kinase network around PKB/AKT1*. *Nature*, 2007. **450**: p. 725-730.
50. Roppenser B, K.H., Canadien V, Xu R, Devreotes PN, Grinstein S, Brumell JH., *Multiple host kinases contribute to Akt activation during Salmonella infection*. *PLoS One*, 2013. **8**(8): p. e71015.

51. Basu S, T.N., Irwin MS, Sudol M, Downward J., *Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis*. Mol Cell, 2003. **11**(1): p. 11-23.
52. Eleonora Lapi, S.D.A., Sara Donzelli, Hilah Gal, Eytan Domany, Gideon Rechavi, Pier Paolo Pandolfi, and S.S. David Givol, Xin Lu, Giovanni Blandino, *PML, YAP, and p73 are components of a proapoptotic autoregulatory feedback loop*. Molecular Cell, 2008: p. 803-814.
53. Datsenko KA, W.B., *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6640-5.
54. Mallo GV, E.M., Smith AC, Terebiznik MR, Aleman A, Finlay BB, Rameh LE, Grinstein S, Brumell JH., *SopB promotes phosphatidylinositol 3-phosphate formation on Salmonella vacuoles by recruiting Rab5 and Vps34*. J Cell Biol, 2008. **182**(4): p. 741-52.
55. Knodler LA, C.J., *Eating the strangers within: host control of intracellular bacteria via xenophagy*. Cell Microbiol, 2011. **13**(9): p. 1319-27.
56. Levine B, Y.J., *Autophagy in cell death: an innocent convict?* J Clin Invest, 2005. **115**(10): p. 2679-88.
57. Shi J, W.H., Guan H, Shi S, Li Y, Wu X, Li N, Yang C, Bai X, Cai W, Yang F, Wang X, Su L, Zheng Z, Hu D., *IL10 inhibits starvation-induced autophagy in hypertrophic scar fibroblasts via cross talk between the IL10-IL10R-STAT3 and IL10-AKT-mTOR pathways*. Cell Death Dis, 2016. **7**: p. e2133.
58. Song Q, M.B., Cheng J, Gao Y, Jiang K, Chen J, Yuan Z, Meng S., *YAP enhances autophagic flux to promote breast cancer cell survival in response to nutrient deprivation*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0120790.
59. Xiao L, S.X., Zhang Y, Zhu Y, Zhu L, Tian W, Zhu BK, Wei ZL., *YAP induces cisplatin resistance through activation of autophagy in human ovarian carcinoma cells*. Onco Targets Ther, 2016. **9**: p. 1105-14.
60. Kim J, K.M., Viollet B, Guan KL., *AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(2): p. 132-41.
61. Kabeya Y, M.N., Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T., *LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 13): p. 2805-12.
62. Zheng YT, S.S., Brech A, Lamark T, Johansen T, Brumell J. H., *The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway*. J Immunol, 2009. **183**(9): p. 5909-16.

63. Steele-Mortimer O, K.L., Marcus SL, Scheid MP, Goh B, Pfeifer CG, Duronio V, Finlay BB, *Activation of Akt/Protein Kinase B in Epithelial Cells by the Salmonella typhimurium Effector SigD*. Journal of biological chemistry, 2000. **275**(1): p. 37718-37724.
64. Chaulk SG, L.V., Hiemer SE, Fahlman RP, Varelas X., *The Hippo pathway effectors TAZ/YAP regulate dicer expression and microRNA biogenesis through Let-7*. J Biol Chem, 2014. **289**(4): p. 1886-91.
65. Lindsay DR, N.F., Yuan F, Steven P, Leonard JF., *Phosphoproteomic Analysis of Salmonella-Infected Cells Identifies Key Kinase Regulators and SopB-Dependent Host Phosphorylation Events*. Host-pathogen interactions, 2011. **4**(191): p. 1-13.
66. Roppenser B, G.S., Brumell JH., *Modulation of host phosphoinositide metabolism during Salmonella invasion by the type III secreted effector SopB*. Methods Cell Biol, 2012. **108**: p. 173-86.
67. Miao EA, A.-A.C., Dors M, Clark AE, Bader MW, Miller SI, Aderem A., *Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf*. Nat Immunol, 2006. **7**(6): p. 569-75.
68. Chen KW, G.C., Sotomayor FV, Stacey KJ, Tschopp J, Sweet MJ, Schroder K., *The neutrophil NLRC4 inflammasome selectively promotes IL-1beta maturation without pyroptosis during acute Salmonella challenge*. Cell Rep, 2014. **8**(2): p. 570-82.
69. Kayagaki N, S.I., Lee BL, O'Rourke K, Anderson K, Warming S, Cuellar T, Haley B, Roose-Girma M, Phung QT, Liu PS, Lill JR, Li H, Wu JS, Kummerfeld S, Zhang J, Lee WP, Snipas SJ, Salvesen GS, Morris LX, Fitzgerald L, Zhang YF, Bertram EM, Goodnow CC, Dixit VM., *Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling*. Nature, 2015. **526**(7575): p. 666-671.
70. Liu X, Z.Z., Ruan JB, Pan YD, Magupalli VG, Wu H, Lieberman J., *Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores*. Nature, 2016. **535**(7610): p. 153-+.
71. Cemma M, K.P., Brumell JH., *The ubiquitin-binding adaptor proteins p62/SQSTM1 and NDP52 are recruited independently to bacteria-associated microdomains to target Salmonella to the autophagy pathway*. Autophagy, 2011. **7**(3): p. 341-5.
72. Verlhac P, V.C., Faure M., *Dual function of CALCOCO2/NDP52 during xenophagy*. Autophagy, 2015. **11**(6): p. 965-966.
73. Kreibich S, E.M., Fredlund J, Ramo P, Munz C, Dehio C, Enninga J, Hardt WD., *Autophagy Proteins Promote Repair of Endosomal Membranes Damaged by the Salmonella Type Three Secretion System 1*. Cell Host Microbe, 2015. **18**(5): p. 527-37.

74. Lopez-Montero N, R.-M.E., Risco C, Garcia-del Portillo F., *Intracellular Salmonella induces aggregophagy of host endomembranes in persistent infections*. *Autophagy*, 2016. **12**(10): p. 1886-1901.
75. Neves P, L.V., Calderon-Gomez E, Roch T, Stervbo U, Shen P, Kuhl AA, Loddenkemper C, Hauray M, Nedospasov SA, Kaufmann SH, Steinhoff U, Calado DP, Fillatreau S., *Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during Salmonella typhimurium infection*. *Immunity*, 2010. **33**(5): p. 777-90.
76. J., H., *Autophagy and cytokines*. *Cytokine*, 2011. **56**(2): p. 140-4.
77. Ruan HH, Z.Z., Wang SY, Nickels LM, Tian L, Qiao JJ, Zhu J., *Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) mediates ubiquitination-dependent STAT3 activation upon Salmonella Typhimurium infection*. *Infect Immun*, 2017.