



Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas | Departamento de Ciencias Biológicas

**Regulación de la virulencia en
Bordetella bronchiseptica por BvgR,
una proteína EAL atípica**

MARÍA DE LA PAZ GUTIÉRREZ

Tesis Doctoral

2021

Directores

Dr. Federico Sisti y Dra. Julieta Fernández

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas (Área Ciencias Biológicas) ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM, UNLP-CONICET), del Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Prof. Dr. Federico Sisti y de la Prof. Dra. Julieta Fernández

Agradecimientos

Primero quiero agradecer a mis directores, Juli y Fede, por permitirme formar parte del grupo CDG y por haberme guiado en este camino de 5 años que fue la Tesis. Sé que soy curiosa y que tengo poca memoria, pero Uds. siempre estuvieron dispuestos a responder mis preguntas, a escuchar mis dudas y a repetirme cómo se hacen las cosas. Gracias por darme lugar a ensayar cosas nuevas sin dejar que me aleje mucho de mi línea de trabajo. Gran mérito. Gracias por su buen trato dentro y fuera del lab, por los retiros de fin de año, por los guisos de lentejas en días patrios y por ser tan atentos y comprensibles.

En segundo lugar, quiero agradecer a la comunidad Vacsal por el día a día, tanto CDG como DH, becarios, investigadores y CPAs. Por los mates con bizcochitos, los almuerzos con 25°C +/- 20°C en el pasillo, el trabajo de mesada compartido, las charlas enriquecedoras sobre ciencia y sobre la vida. Nos faltó un año entero de cerveza, pues COVID, pero no faltará oportunidad.

Al resto del IBBM que por más que nos separen unas escaleras insufribles nunca me sentí muy lejos. Todos siempre me han hecho sentir muy cómoda y lo valoro mucho. Quiero agradecer especialmente a RPS por haberme dejado estar tantas veces en la oficina de incógnita, por siempre ofrecerme un mate y por escucharme hablar mientras que trabajaban (perdón). Mas aun, gracias por haberme incluido como uno de ustedes en este último tramo tras un año tan complicado, sobre todo a Hila y a Eze, mis compañeros de turno que me explicaron todo y me tuvieron mucha paciencia. Gracias R3 por la buena onda durante el uso del bendito espectrofotómetro y VV por salir al rescate de westerns en apuros.

Gracias a Chari, a Mai y a Lucas, por su amistad y por tanto apoyo moral. Mención especial a Lucas por ser mi reportero oficial transmitiendo desde planta baja, dispuesto a ayudarme en todo y a Maius por ser mi inmunóloga de referencia. Y a vos Chari, por no formar parte de la investigación y sacarme de ese mundo. También gracias a Según por traerme paz en los recreitos de mi última semana de escritura y por ser tan lindo.

Gracias a todos mis otros amigos que me dio la facultad. Nati, Negri, Juli, gracias por ser tan hermosas, incondicionales y por toda la alegría compartida. Gracias Maga por existir y por mandarme fotos de cerveza para que me sienta un poquito más cerca tuyo. Las extraño.

Gracias a Heath y a Mariette por haberme integrado a la DB lab family y haber hecho que Morgantown, WV, haya sido como un segundo hogar para mí. Gracias a todos por haberme recibido con tanto amor, por haberme enseñado tanto, por entender mi inglés y responder cada pregunta que hice, por incluirme en su rutina y en sus fechas especiales. Gracias por tantas cervezas, tantas risas y por su amistad.

Gracias a mis hermanas del alma, que sin importar cuan cerca o lejos hayamos estado geográficamente, siempre estuvieron conmigo. Gracias por aprenderse el nombre de mis bacterias, significa un montón.

Gracias a mi familia entera por haberme incitado a ser curiosa desde chica, por motivarme y apoyarme toda mi vida y en particular, estos últimos 5 años. Por estar felices por mis logros, por preocuparse por mí, por disfrutar cada viaje como si estuvieran conmigo y por escuchar cada explicación científica que di alguna vez. A aquellos que están y a los que no están también, que siempre estuvieron orgullosos de mis estudios, la única mujer de la generación y, además, científica. Este agradecimiento incluye a las mascotas por supuesto, por soportar tanto amor de mi parte.

Agradezco, inclusive, a cada persona que conocí en estos últimos 5 años, a aquellos que crucé en viajes, cursos, congresos, y en la vida misma. Es increíble cómo a veces pequeñas charlas con personas desconocidas son tan enriquecedoras y cómo te alegran los días las personas menos pensadas.

Y, por último, gracias a la naturaleza y a la ciencia mismas por ser tan lindas. ¿Qué seríamos sin ellas? La ciencia me dio trabajo, me enseñó muchísimo y me permitió conocer a gente que quiero mucho. La naturaleza nos da vida y PAZ.

Índice

Introducción general	8
1. <i>Bordetella bronchiseptica</i>	9
a. <i>Bordetella</i> spp.	9
b. Las clásicas <i>Bordetellas</i>	11
c. Modelo animal	13
2. Regulación por el sistema de dos componentes BvgAS	14
a. Mecanismo	14
b. Factores de virulencia	19
Hemaglutinina filamentosa	20
Fimbrias	22
Pertactina	23
Lipopolisacárido	23
Adenilato ciclasa-hemolisina	24
Sistema de secreción tipo III	27
Otras toxinas	31
Citotoxina traqueal	31
Toxina dermonecrótica	31
c. Factores de avirulencia	32
<i>Virulence-repressed genes (vrgs)</i>	33
Ureasa	34
Sideróforo alcalino	35
Flagelo	35
3. BvgR	39
a. Antecedentes	39
4. Regulación mediada por el segundo mensajero c-di-GMP	42
a. Conceptos generales	42
b. Mecanismo de regulación mediada por c-di-GMP	46
c. c-di-GMP en <i>Bordetella</i>	48
5. Biofilm	51
a. Biofilm en <i>Bordetella</i>	53
Proteínas y estructuras involucradas en la formación de biofilm	55
Regulación de la formación de biofilm en <i>Bordetella</i>	57
Objetivo general y específicos	59
Resultados	60
Capítulo 1: Análisis bioinformático y bioquímico de la posible actividad fosfodiesterasa de BvgR	61
Introducción	62
1. Análisis bioinformático	62
a. Dominio EAL. Localización de aminoácidos relevantes	62

2. Purificación de BvgR	72
a. Ensayos de expresión y purificación	72
b. Insolubilidad de BvgR	74
c. Fusión a MBP	76
3. Actividad fosfodiesterasa	78
a. BvgR y el fenotipo de movilidad asociado a fosfodiesterasas	78
Conclusiones	81
Capítulo 2: Análisis transcriptómico de genes diferencialmente regulados por BvgR	84
Introducción	85
1. Análisis transcriptómico	86
a. Genes involucrados en la movilidad celular	93
b. Genes involucrados en el metabolismo de c-di-GMP	94
c. Genes del SST3	94
d. Comparación con estudios anteriores	95
2. Validación de resultados	100
Conclusiones	101
Capítulo 3: Relación de BvgR con la regulación mediada por c-di-GMP: movilidad	106
Introducción	107
1. Flagelina	107
a. Fosfodiesterasas sobreexpresadas en el mutante <i>BbΔbvgR</i>	114
Conclusiones	117
Capítulo 4: Relación de BvgR con la regulación mediada por c-di-GMP: formación de biofilm	119
Introducción	120
1. Formación de biofilm <i>in vitro</i>	120
2. Participación de la ACT	124
3. Participación de la flagelina	128
Conclusiones	129
Capítulo 5: Descripción de factores virulencia regulados por BvgR: Sistema de secreción Tipo III	133
Introducción	134
1. Citotoxicidad	135
Conclusiones	137

Capítulo 6: Estudio del rol de BvgR en la infección y en la respuesta inmune en un modelo murino	139
Introducción	140
1. Análisis de la colonización del tracto respiratorio murino	142
2. Evaluación de la respuesta inmune de los ratones	144
a. Análisis de sangre por contador hematológico	145
b. Poblaciones de células del sistema inmune determinadas por citometría de flujo	148
Análisis de las muestras de sangre	148
Análisis de las muestras de pulmón	150
Análisis de las muestras de lavado nasal	151
c. Respuesta inducida a nivel de citoquinas secretadas	153
Conclusiones	158
Conclusiones generales	162
Materiales y Métodos	172
1. Técnicas microbiológicas	173
2. Técnicas de biología molecular	176
3. Técnicas utilizadas para análisis transcriptómicos	183
4. Técnicas utilizadas para análisis proteómicos	186
5. Técnicas para análisis fenotípicos	191
6. Modelo murino de infección	193
7. Programas estadísticos y herramientas bioinformáticas	196
Anexo I	197
1. Medios de cultivo	197
2. Soluciones	198
3. <i>Buffers</i>	199
Anexo II	201
1. <i>Primers</i>	201
Anexo III	203
1. Genes diferencialmente expresados entre <i>BbWT</i> y <i>BbbvgR</i> (RNA-seq)	203
Bibliografía	219

Introducción general

1. *Bordetella bronchiseptica*

a. *Bordetella* spp.

El género *Bordetella* pertenece a la familia de las Alcaligenaceae, dentro de la clase de las β -proteobacterias, y hasta la fecha cuenta con dieciséis especies descritas (Bjørnstad and Harvill, 2005). Desde un punto de vista microbiológico, las *Bordetellas* son cocobacilos Gram negativos, de tamaño pequeño (0,2-0,7 μm), no fermentadores de azúcares y difíciles de cultivar en el laboratorio. Gran parte de las especies del género son patogénicas y estrictamente aeróbicas. Las principales especies del género son *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*, las cuales presentan una estrecha relación filogenética y por ello se las conoce como “clásicas *Bordetellas*”. Éstas resultan las *Bordetellas* más estudiadas debido a que causan infecciones respiratorias en distintos mamíferos y, por ende, impactan directamente en la sociedad. *B. pertussis* es el agente etiológico de la tos convulsa, una enfermedad respiratoria muy contagiosa que afecta a todos los grupos etarios pero que resulta particularmente grave en bebés y niños (Mattoo and Cherry, 2005). *B. parapertussis* es una especie que engloba dos linajes: un linaje adaptado a humanos que causa una enfermedad tipo tos convulsa (*Bpp_{hu}*) y otro adaptado a ovejas (*Bpp_{ov}*) (Mattoo and Cherry, 2005). Por último, *B. bronchiseptica* es la especie que presenta el rango de huésped más amplio y causa enfermedades respiratorias en numerosos mamíferos, entre los cuales se incluyen cerdos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones e inclusive humanos inmunocomprometidos (Goodnow, 1980).

Además de las clásicas *Bordetellas*, el género contiene otras trece especies, denominadas no clásicas: *B. holmesii*, *B. avium*, *B. hinzii*, *B. pseudohinzii*, *B. trematum*, *B. ansorpii*, *B. bronchialis*, *B. petrii*, *B. sputigena*, *B. flabilis*, *B. muralis*, *B. tumulicola* y *B. tumbae*. *B. holmesii* es un patógeno humano estricto aislado por primera vez en 1983 y que desde entonces se ha encontrado en sangre de pacientes con septicemia y en muestras de nasofaringe de pacientes con enfermedad tipo-pertussis. *B. avium* causa enfermedades respiratorias en aves de corral cuyos síntomas clínicos se conocen como bordetelosis aviar o coriza de pavo, y también puede afectar a otras aves domésticas o salvajes. *B. hinzii*, por su parte, es considerada una bacteria comensal en el tracto respiratorio de aves de corral, aunque puede establecer infecciones en crías de pavo, así como en pacientes inmunocomprometidos. *B. pseudohinzii*, estrechamente relacionada a *B. hinzii*, infecta naturalmente ratones de laboratorio y se ha encontrado en ratas salvajes en Malasia. El aislamiento de *B. trematum* y *B. ansorpii* es muy raro, pero en general, estas especies están asociadas a heridas infectadas en pacientes inmunocomprometidos. *B. bronchialis*, *B. sputigena* y *B. flabilis* se han aislado recientemente de muestras colectadas del

tracto respiratorio de pacientes con fibrosis quística y existen muy pocos reportes sobre ellas. *B. petrii* representa la especie más cercana al ancestro común de origen ambiental de las *Bordetellas*. Es la única especie anaerobia facultativa dentro del género y se encuentra presente en distintos nichos ambientales formando consorcios microbianos tanto en tierra como en agua, aunque también se ha aislado de infecciones en pacientes inmunocomprometidos o con fibrosis quística. En un estudio reciente, se describieron tres nuevas especies ambientales de *Bordetella*, *B. muralis*, *B. tumulicola* y *B. tumbae*, que han sido aisladas de la superficie de una pared de yeso de pinturas murales de 1300 años en Japón (Srigley, Goldfarb and Pernica, 2015; Tazato *et al.*, 2015; Soumana, Linz and Harvill, 2017; Linz *et al.*, 2019).

El potencial ancestro de las *Bordetellas* patógenas probablemente contaba con varios sistemas de secreción, pero carecía de las toxinas más características de *Bordetella*, la toxina pertussis, la adenilato ciclasa-hemolisina y la toxina dermonecrótica. Los genes que codifican para estas toxinas habrían sido adquiridos por un ancestro de las clásicas *Bordetellas* mientras que *B. avium* adquirió la toxina dermonecrótica de manera independiente en otra localización cromosomal. Todas las *Bordetellas* patógenas poseen receptores de hierro hemo, pero no así la cepa ambiental *B. petrii*, lo cual sugiere que representa una adaptación al estilo de vida asociado a un huésped. Por otro lado, las adhesinas y autotransportadores especie-específicas fueron adquiridas tanto de manera vertical como horizontal (Linz *et al.*, 2016).

Una comparación entre los genomas disponibles de *Bordetella* revela que *B. petrii* y *B. bronchiseptica* presentan los genomas de mayor tamaño (~5,3 Mb), mientras que las especies huésped-específicas presentan genomas más pequeños (3,7 – 4,8 Mb) (Parkhill *et al.*, 2003). Según el análisis filogenético de las *Bordetellas* cuyo genoma ha sido secuenciado se pueden clasificar en tres clados: uno compuesto por *B. petrii* y *B. ansorpii*, otro compuesto por *B. hinzii*, *B. pseudohinzii*, *B. avium* y *B. holmesii* y un tercer clado compuesto por las clásicas *Bordetellas*, (*B. pertussis*, *B. parapertussis* (humana y ovina) y *B. bronchiseptica*) (Linz *et al.*, 2019).

B. pertussis y *B. parapertussis* (Bpp_{hu}) evolucionaron independientemente de un ancestro tipo-*B. bronchiseptica*. Las clásicas *Bordetellas* comparten más de un 98% de identidad de genes lo cual demuestra la baja diversidad génica entre especies. Esto sugiere que la emergencia de *B. parapertussis* y *B. pertussis* a partir de un ancestro tipo-*B. bronchiseptica* es relativamente reciente, lo cual concuerda con los análisis filogenéticos del genoma de *B. pertussis* a nivel global, que ubica la divergencia de dos ramas hace 2300 años (Linz *et al.*, 2019).

Resulta interesante que varias de las especies *Bordetella* han emergido como huéspedes estrictos en la época antropocéntrica relativamente reciente, cuando las actividades humanas tuvieron un mayor impacto en la población de animales “domesticables”. Estas observaciones apoyan la especulación de que la emergencia de las especies de *Bordetella* huésped-específicas se debe a factores antropogénicos (Linz *et al.*, 2019).

Como se mencionó, las especies del género que evolucionaron y se adaptaron para infectar sólo humanos sufrieron una pérdida e inactivación génica a gran escala durante el proceso, similar a la reducción del genoma asociada a la especiación al huésped de otros patógenos. La reducción genómica fue mediada por recombinación homóloga entre secuencias de inserción (IS). En el caso de *B. pertussis* las numerosas secuencias IS481 mediaron la delección de gran parte del genoma, resultando en la pérdida de más de 1000 genes, mientras que en el caso de *B. parapertussis* la reducción fue menor y las regiones delecionadas se encuentran flanqueadas por secuencias IS1001. El genoma de *B. holmesii*, la única especie patógena humana estricta no clásica, también sufrió una drástica reducción en su tamaño mediada por IS407, IS481 y ISL3. El tamaño del genoma *B. holmesii* es similar al de *B. avium* (patógeno ave-específica), menor al de su relativo más cercano *B. hinzii* (Linz *et al.*, 2019). La baja diversidad genética entre estas especies sugiere que los eventos de especiación estuvieron asociados con cuellos de botella, de manera que disminuyó la diversidad genética y se expandieron los clones exitosos.

b. Las clásicas *Bordetellas*

B. pertussis es el principal agente causal de la tos convulsa, también conocida como pertussis o coqueluche, que es una enfermedad respiratoria humana altamente contagiosa. Como ya se dijo, es un patógeno exclusivo de humanos y dado que no se conoce ningún reservorio animal o ambiental se ha postulado que su transmisión ocurre a través de la inhalación de aerosoles producidos por individuos infectados. Numerosos estudios han demostrado que adolescentes y adultos resultan los reservorios de *B. pertussis* y son la principal fuente de transmisión a niños e infantes que no han completado su esquema de vacunación (Nieves and Heininger, 2016).

A diferencia de otras enfermedades infecciosas que han impactado en los humanos, como la viruela o la poliomielitis, pertussis carece de una historia antigua. Según Lapin, la primera mención de la enfermedad fue en “El Espejo de la Salud” de Moulton en 1540, haciendo referencia a un brote en Francia en 1414. Su primera epidemia fue en París en 1578 y en 1679, Sydenham nombró la enfermedad como pertussis, que significa tos violenta. Bordet y Gengou

fueron los primeros en aislar a la bacteria causante de la enfermedad en 1906, luego de haberla encontrado microscópicamente en un esputo de un paciente con pertussis en 1900. Considerando la gravedad de esta enfermedad en infantes, la búsqueda por una vacuna comenzó poco después de que se lograra cultivar el organismo en el laboratorio (Mattoo and Cherry, 2005).

En la década de 1940 se desarrolló la vacuna de célula entera y se logró controlar la epidemia de esta enfermedad. No obstante, con el propósito de reducir los efectos colaterales producidos por esta vacuna, en la década de los 90 se implementó en algunos países una vacuna acelular compuesta por componentes purificados de *B. pertussis*. A pesar de la amplia cobertura de vacunación a nivel mundial, esta enfermedad ha resurgido en las últimas décadas. El aumento en la incidencia de esta enfermedad se correlaciona con el cambio en la vacuna utilizada, de celular a acelular. Numerosos estudios sugieren que este fenómeno tiene origen multifactorial, entre los que se incluyen la duración de la inmunidad inducida por la vacuna acelular, la variación génica del patógeno y una mayor vigilancia epidemiológica (Mooi, 2010). De hecho, estudios recientes realizados en el modelo de infección de babuinos han demostrado que la vacuna acelular no previene la colonización ni la transmisión secundaria de *B. pertussis* (Warfel, Zimmerman and Merkel, 2014). Está claro que en orden de mejorar la estrategia de vacunación contra la tos convulsa es crucial entender la patogénesis de *B. pertussis*, cómo sobrevive en los diferentes nichos del huésped y su mecanismo de transmisión.

La especie *B. paraptussis*, como se ha mencionado, se separa en dos linajes con origen filogenético distinto: uno capaz de colonizar humanos y el otro ovejas, sin haber transmisión entre estos reservorios. *Bpp_{Hu}* es uno de los agentes causales de la tos convulsa y fue aislado por primera vez en un niño con pertussis en 1930, por Eldering y Kendrick. El cuadro clínico producto de la infección con *Bpp_{Hu}* es menos severo que el de *B. pertussis*, con una menor duración de la tos y sin cursar linfocitosis (Mattoo and Cherry, 2005).

B. bronchiseptica es reconocida como el agente causal de la traqueobronquitis infecciosa en perros (tos de las perreras) y de la rinitis atrófica en cerdos, pero también es capaz de colonizar el tracto respiratorio de otros mamíferos, como gatos, conejos, ratas y ratones. Adicionalmente se ha reportado como causante de enfermedades respiratorias en humanos, en particular en individuos inmunocomprometidos, como pacientes con VIH o fibrosis quística, aunque ha sido reportada infectando pacientes inmunocompetentes (Woolfrey and Moody, 1991). Las infecciones ocasionadas por *B. bronchiseptica* repercuten en la sociedad, al afectar especies domésticas y a la industria porcina a nivel mundial ya que causan importantes pérdidas

económicas. En este sentido, se han desarrollado vacunas para prevenir la infección por parte de *B. bronchiseptica* en cerdos, gatos y perros, las cuales contienen la bacteria inactivada o viva atenuada (MSD Salud Animal, 2015; Merck Animal Health USA, no date).

Un sello distintivo de la infección con *B. bronchiseptica* es que los animales pueden ser portadores asintomáticos por largo plazo e inclusive de por vida, de manera que pueden contagiar a animales susceptibles (Coutts *et al.*, 1996; Schulz *et al.*, 2014). En estudios de laboratorio la infección de ratas, ratones y conejos con *B. bronchiseptica* ha resultado en la colonización crónica y asintomática del sistema respiratorio superior (Goodnow, 1980; Mattoo, Miller and Cotter, 2000). Cabe mencionar que *B. bronchiseptica* ha sido recuperada de las cavidades nasales aún de animales vacunados, sugiriendo que las vacunas disponibles son eficaces a la hora de reducir la tasa de mortalidad, pero no a la hora de prevenir la colonización (Stephenson *et al.*, 1989).

Aunque no son consideradas patógenos intracelulares, las clásicas *Bordetellas* son capaces de sobrevivir dentro de células fagocíticas. Adicionalmente, se ha reportado que *B. bronchiseptica* es capaz de infectar y persistir dentro de amebas (Taylor-Mulneix *et al.*, 2017). Este hallazgo plantea la posibilidad de que las amebas sean un reservorio ambiental de *B. bronchiseptica*, ya que además ésta puede diseminarse a través de las esporas de la ameba y ser transportada por insectos.

c. Modelo animal

El principal modelo de estudio de la patogénesis de las bacterias del género *Bordetella* hasta la fecha ha sido el modelo de infección del tracto respiratorio murino. Estos experimentos, en los cuales las bacterias son administradas por vía intranasal o en aerosol, han permitido descifrar los roles de determinados factores de virulencia durante el proceso de colonización, inclusive en aquellas especies cuyo huésped natural es exclusivamente el humano. Sin embargo, las altas dosis infectivas de *B. pertussis* y *B. paraptussis* requeridas para establecer la colonización en ratones indican que este modelo es limitado en cuestiones de sensibilidad y en su capacidad de reflejar la interacción que presentan estos patógenos con el sistema inmune humano (Mattoo and Cherry, 2005).

Por el contrario, el uso de animales de laboratorio permite estudiar tanto la patogénesis de *B. bronchiseptica*, así como la interacción entre *Bordetella*-huésped en un modelo de infección natural. Notablemente, 5 µl de un cultivo de *B. bronchiseptica* administrados a las narinas de ratones, ratas o conejos, es suficiente para que se establezca la infección y persista en la cavidad

nasal, laringe, tráquea y pulmones, aun cuando los animales no presentan síntomas clínicos (Mattoo and Cherry, 2005). Las muestras de pulmón o tráquea obtenidas de estos animales no muestran lesiones macroscópicas y los exámenes histológicos rara vez presentan inflamación. Asimismo, se ha establecido que la dosis infectiva 50 (DI_{50}) de la cepa *B. bronchiseptica* RB50 para conejos, ratas y ratones es menor a 200, 20 y 5 unidades formadoras de colonias (UFC), respectivamente, lo cual deja en claro que estos modelos son capaces de reflejar las características de una infección que ocurre de manera natural (Cotter and Miller, 1994; Cotter *et al.*, 1998; Dewan *et al.*, 2017). La disponibilidad de ratones *knock-out*, así como el vasto conocimiento que se tiene de su sistema inmune permiten investigar la dinámica más en profundidad.

Tanto la estrecha relación filogenética entre las clásicas *Bordetellas* como la conservación de gran parte de los factores de virulencia entre ellas, han llevado a numerosos grupos a estudiar aquellos factores implicados en el proceso de infección y que están compartidos entre las tres especies mediante un modelo de infección de *B. bronchiseptica* en un huésped natural.

Recientemente se ha desarrollado un modelo de pertussis en babuinos (*Papio anubis*) (Warfel, Zimmerman and Merkel, 2014). La infección por vía nasofaríngea de *B. pertussis* en babuinos jóvenes resulta en la manifestación de una enfermedad similar a la tos convulsa en niños, es decir fiebre baja, tos paroxística, linfocitosis, aumento robusto en la cantidad de anticuerpos contra *B. pertussis* y como consecuencia protección del tipo convaleciente. La particularidad y gran ventaja de este modelo es que permite estudiar la transmisión entre individuos. La aplicación de este modelo permitió establecer que la vacunación con la formulación acelular previene el desarrollo de síntomas de la enfermedad, pero no la colonización del tracto respiratorio ni la transmisión. Este resultado sugiere que los individuos asintomáticos podrían ser capaces de transmitir la infección a infantes que todavía no completaron su esquema de vacunación (Melvin *et al.*, 2014).

2. Regulación por el sistema de dos componentes BvgAS

a. Mecanismo

Las bacterias, así como el resto de los organismos vivos, deben ser capaces de sentir su entorno y responder apropiadamente para sobrevivir. De esta manera, los cambios deben ocurrir tanto cuando el entorno cambia como cuando la bacteria se mueve de un entorno a otro.

Generalmente, las respuestas bacterianas conllevan un cambio en la expresión génica por lo que la transición no ocurre de manera instantánea ni abrupta, sino que ocurre como una secuencia de eventos producto de una adecuada regulación temporal. Una vez que la bacteria se adapta al nuevo entorno su perfil de expresión se mantiene constante gracias a una adecuada regulación. El perfil se mantendrá constante hasta que las condiciones externas cambien nuevamente. La regulación temporal es clave para el proceso de adaptación ya que la inapropiada expresión génica en un momento dado puede tener un impacto negativo en la supervivencia bacteriana.

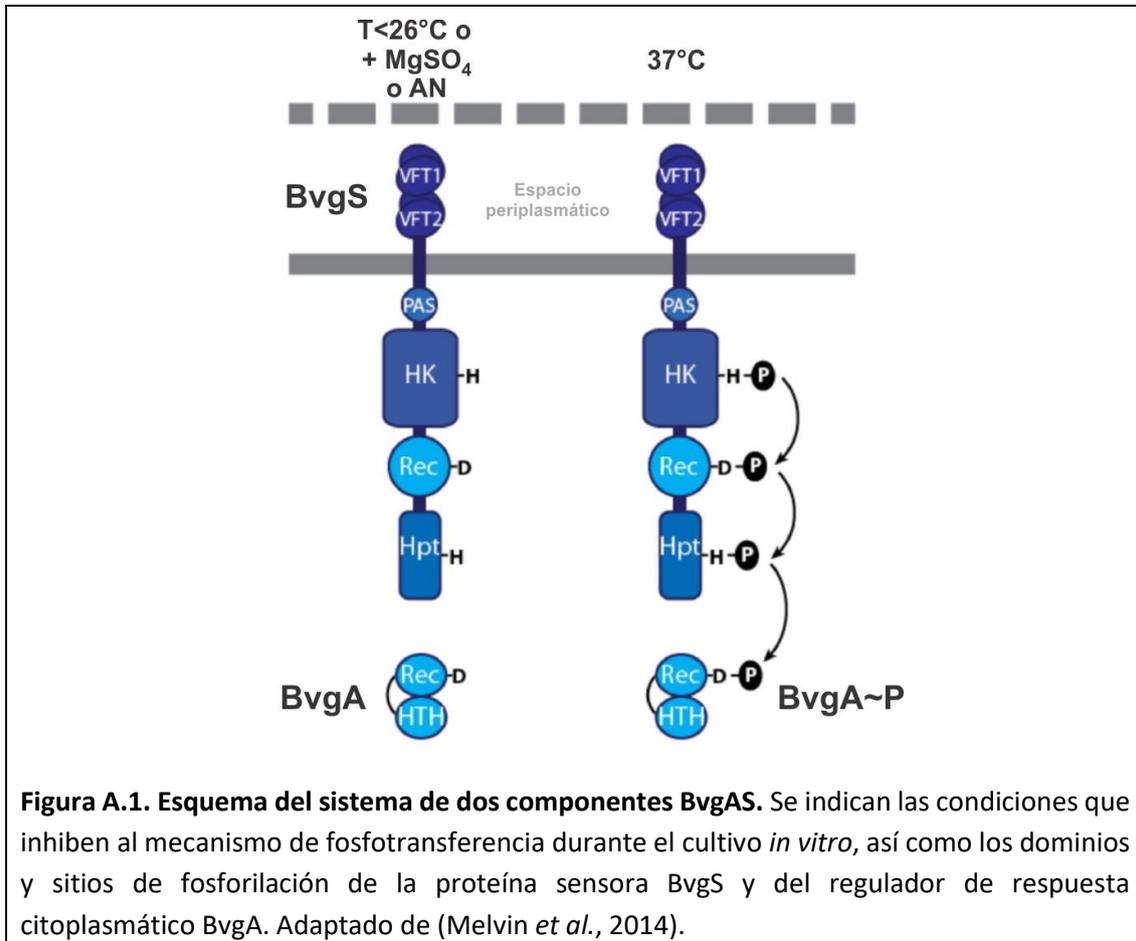
La habilidad de las bacterias de responder al entorno es un rasgo muy importante durante el proceso evolutivo. La dinámica en la relación entre un patógeno y su huésped está, en gran parte, determinada por una variedad de señales que intercambian estos organismos. Mientras que el huésped es capaz de detectar componentes bacterianos, efectores secretados o productos del metabolismo bacteriano, la bacteria puede sentir compuestos antimicrobianos o moléculas de señalización (Curtis and Sperandio, 2011).

Las bacterias del género *Bordetella* son capaces de responder a las variaciones que enfrentan dentro del huésped. Entre otros, se ha descrito que pueden sentir hormonas, hierro, niveles de CO₂ y otros componentes de la sangre (Brickman *et al.*, 2011; Armstrong, Brickman and Suhadolc, 2012; Hester *et al.*, 2012; Gonyar *et al.*, 2017a)).

B. pertussis, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* comparten un sistema de control de la virulencia casi idéntico codificado por el locus *bvgAS* (Mattoo *et al.*, 2001). BvgA y BvgS son miembros de un sistema de dos componentes que usa un mecanismo de señalización de fosfotransferencia. BvgA, de 23 kDa, es un regulador de respuesta que se une a ADN y su capacidad de activar distintas clases de genes depende de la cantidad de BvgA fosforilado (BvgA~P) presente en la célula. Por su parte, BvgS es un sensor quinasa transmembrana y dimérico. Cada monómero, de 135 kDa, contiene un dominio periplasmático compuesto por dos dominios *Venus flytrap* (VFT) en tándem, un segmento transmembrana, un dominio PAS citoplasmático y un dominio histidin quinasa (Figura A.1). BvgA y BvgS de *B. pertussis* y de *B. bronchiseptica* tienen un 100 y un 96% de identidad de secuencia respectivamente y los loci son funcionalmente intercambiables (De Tejada, Miller and Cotter, 1996).

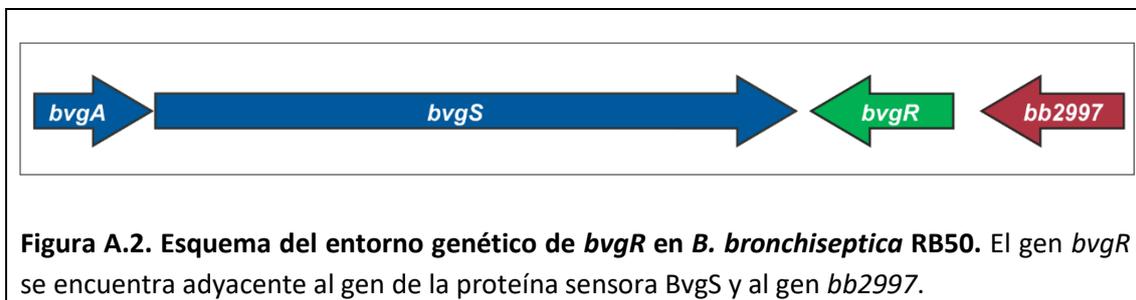
Se ha propuesto que BvgS presenta una alta actividad quinasa por *default* en cultivos crecidos a temperatura óptima (37°C) y sin la necesidad de la unión de un ligando, por lo que los niveles intracelulares de BvgA~P son elevados en dichas condiciones (Lesne *et al.*, 2017). Aunque

las señales relevantes para regular el locus *bvgAS* *in vivo* no han sido determinadas hasta el momento, numerosos estudios han demostrado que en el laboratorio el sistema se puede inactivar mediante el agregado de moduladores como $MgSO_4$ o ácido nicotínico o bien, cuando el cultivo se incubaba a bajas temperaturas (Peggy A. Cotter and Jones, 2003) (Figura A.1).



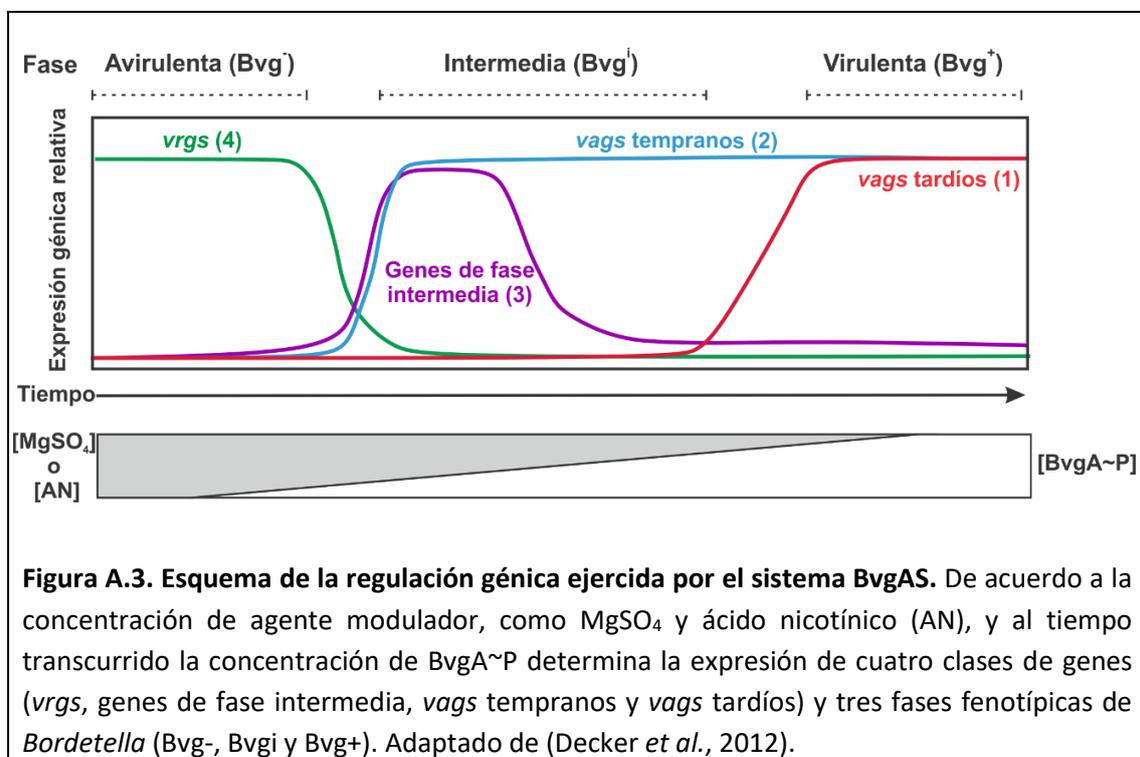
Aunque inicialmente se consideraba que el sistema BvgAS estaba regulado por un mecanismo tipo ON/OFF, este modelo se modificó a medida que el sistema se estudió más en profundidad. A partir de los distintos niveles de fosforilación de BvgA la bacteria puede transicionar entre tres estados con diferentes patrones de expresión génica, aunque los cambios no ocurren de manera brusca sino que forman parte de un cambio génico continuo (P A Cotter and Jones, 2003). De acuerdo a la afinidad de BvgA~P con los promotores de ciertos genes, éstos pueden clasificarse en cuatro clases. La clase 1 contiene genes cuyos promotores tienen sitios que unen BvgA~P con poca afinidad y están ubicados lejos y río arriba del sitio de inicio de la transcripción, como es el caso del gen que codifica para la adenilato ciclasa-hemolisina *cyaA* (*vags*, por *virulente-activated genes*, tardíos). La clase 2 contiene genes cuyos promotores tienen

sitios que unen BvgA~P con alta afinidad y están ubicados cercanos al sitio de inicio de la transcripción, como es el caso del gen que codifica para el precursor de la hemaglutinina filamentosa *fhaB* (*vags* tempranos). La clase 3 tiene sitios que unen BvgA~P con alta afinidad y se encuentran inmediatamente río arriba del sitio de inicio de la transcripción, mientras que además tiene sitios que unen BvgA~P con baja afinidad río abajo del sitio de inicio de la transcripción (genes de fase intermedia); el único ejemplar de esta clase descrito hasta la fecha es *bipA*. Por último, la clase 4 representa a los genes que son reprimidos por BvgAS, como ocurre con los genes flagelares en *B. bronchiseptica*, a pesar de que no se ha caracterizado que sus promotores sean capaces de unir BvgA~P. Los genes clase 4 también son conocidos como *vrgs*, por *virulence-repressed genes*. La represión de algunos de estos genes está mediada por una proteína represora citoplasmática de 32 kDa, BvgR (Merkel, Barros and Stibitz, 1998). El gen que codifica para BvgR se localiza inmediatamente río abajo del locus *bvgAS*, adyacente al gen *bb2997* (Figura A.2), y también es activado por BvgA (Merkel *et al.*, 2003). Por lo tanto, en presencia de BvgA~P BvgR se expresa y la transcripción de los genes que regula está inhibida mientras que en ausencia de BvgA~P BvgR no se transcribe y no media la represión de dichos genes.



De esta manera, cuando el sistema BvgAS se encuentra inactivo los niveles de BvgA~P son demasiado bajos para activar la expresión de los genes de las clases 1, 2 y 3 mientras que la expresión de los genes de la clase 4 es máxima. En estas condiciones, la bacteria se encuentra en fase avirulenta, también conocida como *bvg-*. Cuando la bacteria cambia desde la fase avirulenta a condiciones más propicias, como el cultivo a 37°C y sin el agregado de moduladores, BvgS empieza a fosforilar a BvgA y ya con bajos niveles de BvgA~P se activa la transcripción de los genes de clase 2 y clase 3 y se reprime la de los genes clase 4. En este punto, la bacteria se encuentra en fase intermedia (*bvgi*). Luego de 3 o 4 horas los niveles de BvgA~P son lo suficientemente altos como para promover la transcripción de los genes de la clase 1, y a su vez para reprimir la expresión de los genes de clase 3, debido a la unión de BvgA~P a los sitios

ubicados río abajo del sitio de inicio de la transcripción. Esta fase se conoce como la fase virulenta de la bacteria (bvg^+) en la que la expresión de los *vags* es máxima y la de los genes de la clase 4 (*vrgs*) es mínima. Un estudio realizado con una cepa de *B. pertussis* que se encuentra bloqueada en fase intermedia debido a una mutación en BvgS sugiere que algunos *vrgs* también son expresados durante la fase intermedia de la bacteria y que, por ende, los *vrgs* podrían separarse en subgrupos de acuerdo a su patrón de expresión como ocurre con los *vags* (Lesne *et al.*, 2018). Por el contrario, cuando la bacteria pasa desde la fase virulenta a la avirulenta, BvgS actúa como fosfatasa y el cambio en la expresión génica es inmediata, es decir que no pasa por la fase intermedia (Williams and Cotter, 2007). En la Figura A.3 se presenta un esquema del sistema de regulación por BvgAS descrito anteriormente.



En orden de determinar la importancia del sistema BvgAS *in vivo* se han llevado adelante ensayos de infección en distintos modelos animales, incluyendo ratones, ratas, cerdos y conejos, con cepas bloqueadas en la fase virulenta o en la fase avirulenta. Estos estudios han demostrado que la cepa bloqueada en fase virulenta y que expresa constitutivamente adhesinas y toxinas coloniza el tracto respiratorio de los animales de manera indistinguible de la cepa *wild type* (Cotter and Miller, 1994; Akerley, Cotter and Miller, 1995; Martínez de Tejada *et al.*, 1998b; Nicholson *et al.*, 2012). Además, su valor de DI_{50} (dosis infectiva 50) así como el patrón de

anticuerpos que induce en el huésped son similares a la *wild type* (Cotter and Miller, 1994). Los animales infectados por la cepa bloqueada en fase virulenta tampoco demuestran un mayor daño a nivel de tejido pulmonar, sugiriendo que la represión de adhesinas y toxinas no es necesario para limitar el daño causado por la bacteria. Por el contrario, la cepa bloqueada en fase avirulenta, que expresa los factores de avirulencia pero no los de virulencia, no es capaz de establecer una infección sino que es eliminada rápidamente por el huésped. Además, los animales infectados con la cepa *wild type* no producen anticuerpos que reconozcan proteínas exclusivas de la fase avirulenta, como la flagelina de *B. bronchiseptica* (Cotter and Miller, 1994).

Estos resultados indican que la fase virulenta de *Bordetella* es necesaria y suficiente para el establecimiento de la infección en el tracto respiratorio del huésped. No obstante, no se puede descartar que la fase avirulenta sea relevante durante el proceso de transmisión o en la supervivencia de la bacteria en medios con bajos nutrientes. Por un lado, se ha reportado que *B. bronchiseptica* es capaz de crecer en agua de lago, así como en PBS (Porter and Wardlaw, 1993). Por otro lado, se ha descrito que *B. bronchiseptica* es capaz de sobrevivir en el interior de la ameba *Dictyostelium discoideum*, de diseminarse junto a ella y luego, de infectar ratones (Taylor-Mulneix et al., 2017). La cepa de *B. bronchiseptica* bloqueada en fase avirulenta también es capaz de sobrevivir y diseminarse con *D. discoideum* mientras que la cepa bloqueada en fase virulenta muestra una gran desventaja y apenas es recuperada de las amebas.

Está claro que, a pesar de la presencia de otros sistemas regulatorios en *Bordetella*, el sistema BvgAS es el principal regulador de la virulencia de estas bacterias y que su correcto funcionamiento resulta indispensable tanto para establecer la infección en un huésped como para su supervivencia fuera de éste. Resulta interesante estudiar cómo este sistema se conecta con otros sistemas regulatorios para poder contar con un panorama más completo de lo que realmente sucede dentro de estas bacterias.

b. Factores de virulencia

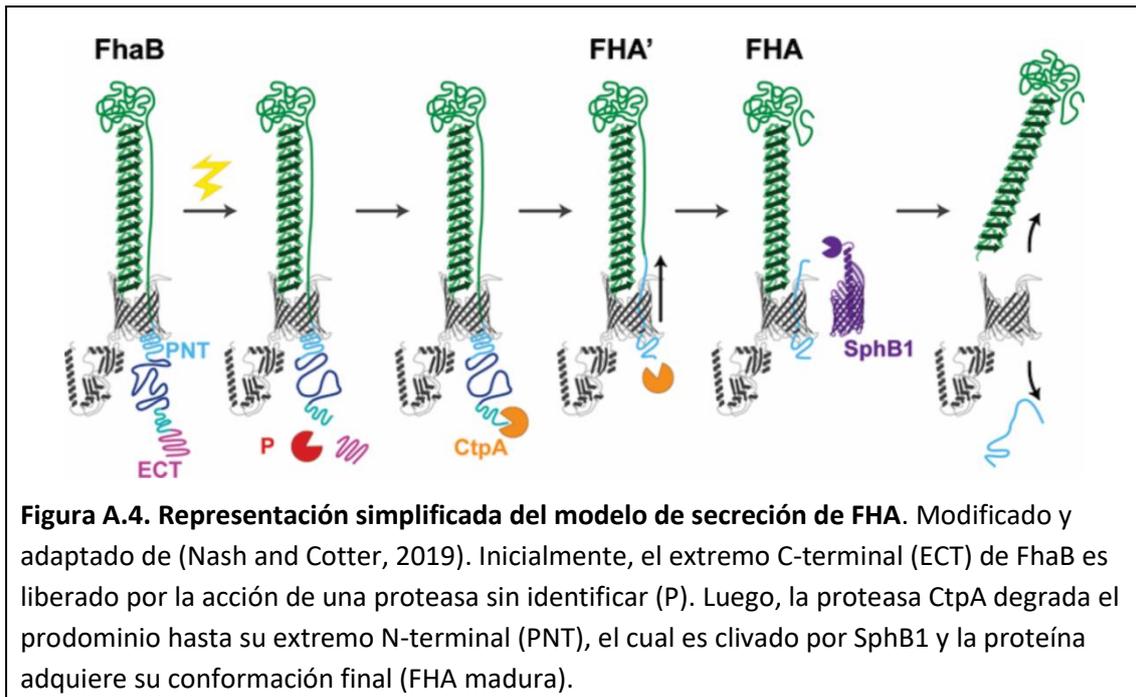
Durante el proceso de infección *Bordetella* spp. sintetiza una serie de factores de virulencia, los cuales en su mayoría pueden clasificarse en adhesinas y toxinas, que contribuyen a la colonización de las superficies mucosas del tracto respiratorio y que son responsables de la patogénesis de la bacteria.

A continuación, se detallan los factores de virulencia de mayor relevancia de *B. bronchiseptica*.

Hemaglutinina filamentosa

La hemaglutinina filamentosa (FHA) es una importante adhesina de las bacterias del género *Bordetella*. Esta proteína es altamente inmunogénica y por ello ha sido incluida en las formulaciones de vacunas acelulares contra pertussis.

FHA es una proteína de 220 kDa con forma de varilla, cuyo precursor es el producto del gen *fhaB*. FhaB, de 367 kDa, es inicialmente secretada a la superficie bacteriana a través de su transportador FhaC, con un mecanismo de secreción tipo two-partner (TPS) (Mattoo *et al.*, 2001). FhaB atraviesa el poro que forma FhaC en la membrana de manera desplegada y en sentido N a C-terminal. Dado que el extremo N-terminal permanece asociado a FhaC, la proteína adquiere una estructura tipo *hairpin* mientras se elonga por fuera de la superficie celular y adopta una estructura secundaria de hélice β . El extremo C-terminal de FhaB está compuesto por una región de aproximadamente 1200 aminoácidos, denominado prodominio, que detiene la translocación de la proteína a través de FhaC. El prodominio resulta indispensable para el correcto plegamiento de la proteína y más específicamente, para la región que fue secretada inmediatamente antes de que se detenga la translocación. El prodominio permanece en el periplasma hasta que es degradado por distintas proteasas (CtpA y otra sin identificar) y eventualmente es clivado por la proteasa SphB1, ubicada en la superficie celular. El clivaje del prodominio de FhaB por SphB1 da lugar a la formación de la proteína FHA y la estructura globular en el extremo distal de la hélice β de FhaB se convierte en el extremo C-terminal de FHA, denominado “dominio C-terminal maduro” (MCD) (Nash and Cotter, 2019). FHA puede de esta manera permanecer asociada a la membrana (mientras un péptido liberado por el clivaje de SphB1 permanece en el canal de FhaC) o puede ser liberada al medio extracelular (cuando dicho péptido se libera de FhaC y desencadena la liberación del extremo N-terminal de FHA) (Figura A.4).



FHA tiene la capacidad de unirse a una gran variedad de células a través de distintos motivos: uno Arg-Gly-Asp (RGD) que le permite unirse a monocitos, macrófagos y probablemente otras células fagocíticas; uno de reconocimiento de carbohidratos (CRD) que media la adhesión a células epiteliales ciliadas del tracto respiratorio, así como a macrófagos; y una región con actividad similar a las lectinas, que reconoce heparina y otros carbohidratos sulfatados, que media la adhesión a células epiteliales no ciliadas y es requerido para la hemaglutinación (Mattoo *et al.*, 2001). De esta manera, FHA interviene en la adhesión a células del epitelio respiratorio y en la promoción de la fagocitosis por parte de macrófagos y neutrófilos (Higgs *et al.*, 2012).

Respecto al rol *in vivo* de FHA, en un principio se había reportado que la inoculación intranasal de ratones con una dosis de 5×10^5 CFUs de una cepa de *B. bronchiseptica* deficiente en FHA origina una respuesta bimodal, es decir que la mitad de los ratones fallece a los 3 días post infección mientras que la otra mitad se mantiene sana (Inatsuka, Julio and Cotter, 2005). Estudios posteriores demostraron que la respuesta bimodal es dosis-dependiente y que la cepa deficiente en FHA induce una respuesta inflamatoria más robusta que la cepa *wild type*, inclusive cuando se usan dosis de inoculación bajas (Henderson *et al.*, 2012). FHA de *B. bronchiseptica* comparte un alto porcentaje de identidad con FHA de *B. pertussis* y han demostrado ser intercambiables tanto *in vitro* como *in vivo* (Julio *et al.*, 2009). En un modelo de infección por aerosol en ratones se observó que una cepa de *B. pertussis* que expresaba una versión de FHA

truncada presentó un menor nivel de colonización de la tráquea durante el inicio de la infección, aunque a tiempos posteriores alcanzó el nivel de la cepa *wild type* (Kimura *et al.*, 1990).

FHA además cumple diversas funciones inmunomodulatorias *in vivo*. Por un lado, se demostró mediante ensayos de infección en ratones que una cepa deficiente en FHA es capaz de inducir una respuesta Th17, que facilita la rápida eliminación de la bacteria, por lo que FHA estaría involucrada en la supresión de la respuesta inflamatoria tipo Th17 (Henderson *et al.*, 2012). Por otro lado, se observó que FHA es capaz de inducir la producción de IL-6 e IL-10 y de suprimir la producción de IL-12 en macrófagos y células dendríticas. Esto lleva a la generación de células T regulatorias que producen IL-10, lo que suprime la producción de IFN- γ y que, por ende, inhibe la respuesta Th1 (Higgs *et al.*, 2012).

Adicionalmente, FHA promueve la formación y el mantenimiento del biofilm formado por *B. pertussis* mediando las interacciones entre bacterias y el sustrato. Serra y colaboradores demostraron que el uso de anticuerpos anti-FHA bloquean la formación de biofilm de *B. pertussis* tanto *in vivo* como *in vitro*. A su vez reportaron que una cepa deficiente en *fhaB* forma menos biofilm *in vitro* e *in vivo* que la cepa parental en la tráquea y el septo nasal de ratones (Serra *et al.*, 2011).

Fimbrias

Como gran parte de las bacterias patogénicas Gram negativas, *Bordetella* spp. expresa estructuras filamentosas de naturaleza proteica en su superficie, denominadas fimbrias, que actúan como adhesinas (Scheller and Cotter, 2015). Éstas están compuestas por una subunidad mayor, que adquiere una estructura tipo varilla, y una subunidad menor, que conforma la punta de la adhesina. Las subunidades mayores más abundantes de *Bordetella* son los serotipos Fim2 y Fim3, aunque *B. bronchiseptica* también expresa FimX, FimN y FimA. Todos los serotipos de fimbria comparten como subunidad menor a FimD. *fimD* forma parte de un operón junto a *fimB* y *fimC*, que codifican para una chaperona y una proteína *usher*, respectivamente.

Las fimbrias de *B. bronchiseptica* median la adhesión al epitelio respiratorio y son requeridas para que la bacteria pueda persistir en la tráquea y los pulmones de ratones infectados tras 14 días post-infección. Asimismo, las fimbrias cumplen un rol inmunomodulatorio ya que una cepa que no presenta fimbrias en su superficie, Δ *fimBCD*, induce un mayor reclutamiento de células inflamatorias a los pulmones y éstos además presentan un nivel mayor de IL-1 β que los pulmones de ratones infectados con la cepa *wild type* (Scheller *et al.*, 2015)

Pertactina

Dentro de las numerosas proteínas de *Bordetella* asociadas a la superficie bacteriana cabe destacar algunas proteínas autotransportadoras (Mattoo *et al.*, 2001). Este tipo de proteínas guían su propia exportación a través de la membrana externa y luego sufren un proceso de autoproteólisis en su extremo C-terminal.

La proteína autotransportadora más relevante de *Bordetella* es la pertactina (PRN). Esta proteína, con un peso molecular que oscila entre 68 y 70kDa dependiendo de la especie de *Bordetella* que se trate, contiene un motivo Arg-Gly-Asp, así como numerosas regiones ricas en prolina y en leucina, motivos característicos de proteínas involucradas en la unión a células eucariotas. La capacidad de la PRN de funcionar como adhesina fue comprobada *in vitro* tanto con proteína purificada como con cepas deficientes en *prn* (Leininger *et al.*, 1991; Nicholson, Brockmeier and Loving, 2009).

Otras proteínas autotransportadoras consideradas factores de virulencia en *Bordetella* son TcfA (con potencial función de adhesina y ausente en *B. bronchiseptica*), BrkA y Vag8 (que aportan resistencia a la muerte por complemento)(Mattoo *et al.*, 2001).

Lipopolisacárido

El lipopolisacárido (LPS) de *Bordetella* spp. es pirogénico, mitogénico, tóxico y puede activar e inducir la producción de TNF- α en macrófagos, similar a las endotoxinas de otras Gram negativas (Mattoo *et al.*, 2001).

El lipopolisacárido (LPS) de *Bordetella* siempre ha llamado la atención dado que se le atribuye la mayoría de los efectos adversos en las composiciones vacunales de célula entera. En las especies principales de *Bordetella* el LPS consta de un lípido A insertado en la membrana externa de la bacteria, un *core* compuesto de heptosas (Kdo) y hexosas y un trisacárido compuesto por N-acetil-N-metil-fucosamina, ácido 2,3-dideoxi-di-N-acetil manosaaminurónico y N-acetilglucosamina.

Los genes que codifican para la síntesis de este trisacárido se encuentran agrupados en el genoma y se denominan *wlbA-L* (Banemann, Deppisch and Gross, 1998). Por el contrario, los genes involucrados en la síntesis del core (serie *waa*) o el lípido A (serie *lpx*) están distribuidos a lo largo del genoma (Parkhill *et al.*, 2003).

B. bronchiseptica y *B. parapertussis* presentan en la porción distal un homopolímero de ácido 2,3-dideoxi-di-N-Acetil-galactosaminurónico, denominado antígeno O. Los genes que codifican para las enzimas necesarias para la síntesis de esta porción están localizados en un mismo loci denominado *wbm* (Preston *et al.*, 1999). Estos genes han sido reemplazados por una secuencia de inserción en *B. pertussis* y por lo tanto esta estructura no se encuentra presente en esta especie, dando como resultado un LPS con la forma lípido A core- trisacárido y por lo tanto, se lo denomina lipooligosacárido (LOS).

La presencia de un LPS completo resulta fundamental para los primeros pasos de infección como la adhesión al epitelio respiratorio (Sisti *et al.*, 2002). El hospedador, a través del receptor de respuesta innata TLR4, es capaz de responder a su presencia. El LPS por sí solo estimula a través de este receptor la secreción de TNF- α y otras citoquinas. La secreción de TNF- α resulta esencial para limitar la infección por *B. bronchiseptica* (Paul B. Mann *et al.*, 2004).

Adenilato ciclasa-hemolisina

La adenilato ciclasa-hemolisina de *Bordetella*, conocida como ACT, AC-Hly o toxina AC, es una toxina bifuncional que posee actividades adenilato ciclasa y hemolisina. Esta toxina se encuentra principalmente bajo el control del sistema BvgAS, expresándose estrictamente en fase virulenta, pero existen otros factores que adicionalmente regulan su expresión y su secreción. Entre ellos se destaca el factor anti-sigma RseA y el factor sigma RpoE (Hanawa *et al.*, 2013; Barbier *et al.*, 2017). Asimismo, la concentración de ACT en el pulmón de ratones infectados es mayor a la detectada *in vitro*, lo cual sugiere la presencia de otro tipo de regulación *in vivo*. En este sentido, Gonyar y colaboradores reportaron que componentes presentes en el suero humano, más específicamente la albúmina y el calcio, estimulan la producción y secreción de ACT en *B. pertussis*, aunque el mecanismo por el cual esto ocurre no ha sido descrito (Gonyar *et al.*, 2017b).

La ACT pertenece a la familia de proteínas Repeats-in-Toxins (RTX). Las proteínas que componen esta familia son toxinas ampliamente distribuidas en bacterias. Dicha familia incluye también otras hemolisinas y leucotoxinas de varios patógenos Gram negativos como *Escherichia coli*, *Mannheimia haemolytica* y *Actinobacillus* spp. (Mattoo *et al.*, 2001). Estas proteínas comparten ciertas características: (i) sufren modificaciones post-traduccionales, (ii) presentan una señal de secreción en el extremo C-terminal sin procesar, (iii) son secretadas al medio mediante un sistema de secreción tipo I (SST1) y (iv) su extremo C-terminal consiste en un dominio de unión a calcio, compuesto por repeticiones ricas en glicina y aspartato. La mayoría

de estas toxinas, además, son capaces de penetrar y permeabilizar las células del hospedador (Guiso, 2017).

La ACT de *Bordetella* se compone por 1706 aminoácidos y contiene cinco dominios: (i) un dominio adenilato ciclasa (AC) en el extremo N-terminal, con un sitio de unión a calmodulina (ii) un dominio de translocación (iii) un dominio hidrofóbico, capaz de formar un poro que le otorga capacidad hemolisina a la toxina (iv) un dominio que contiene los dos residuos de lisina que sufren modificación post-traducciona, y por último (v) un dominio de unión a calcio que contiene las repeticiones de glicina y aspartato, típico de las toxinas RTX. Esta última región, correspondiente al extremo C-terminal, es necesaria para su secreción y posee además el sitio de unión al receptor de la célula huésped (Guiso, 2017).

El gen que codifica para ACT, *cyaA*, se encuentra dispuesto en un operón junto a los genes *cyaBDE*, involucrados en la secreción de la toxina (Laoide and Ullmann, 1990). Adyacente a estos se encuentra el gen que codifica para la enzima responsable de las modificaciones post-traduccionales de la ACT, *cyaC*. Las modificaciones post-traduccionales que sufre esta proteína consisten en la acilación de los residuos Lys 860 y Lys 983 y resultan esenciales para que la ACT se una fuertemente a la célula huésped, así como para que tenga actividad catalítica (Guiso, 2017) (Figura A.5).

Por su parte, el SST1 que secreta a la ACT se compone por tres proteínas: CyaB, CyaD y CyaE. La ACT es secretada como una proteína sin plegar desde el citosol al medio extracelular a través del canal que constituyen las tres proteínas de su SST1 (Vojtova, Kamanova and Sebo, 2006) y se une al calcio presente en el medio, requerido para que se pliegue correctamente (Voegelé *et al.*, 2018) (Figura A.5). Una vez secretada y plegada, la mayor parte de la ACT permanece asociada a la superficie bacteriana. No obstante, únicamente la toxina recién secretada, y no la asociada a la membrana, es capaz de penetrar en la célula huésped y ejercer su actividad citotóxica (Gray *et al.*, 2004).

La ACT puede unirse al receptor de complemento 3 (CR3 o integrinas CD11b/CD18) de las células mieloides del huésped, entre las que se incluyen macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y *natural killers* (Vojtova, Kamanova and Sebo, 2006). Tras unirse al receptor, el dominio AC es traslocado a través de la membrana plasmática hacia el citosol mediante un mecanismo propio, conocido como internalización (Fiser *et al.*, 2012). El mecanismo molecular que lleva a la internalización de la proteína consistiría en un proceso de dos pasos. En el primero, la ACT se une a la superficie celular a través de los receptores mencionados permitiendo la salida

La ACT cumple numerosos roles *in vivo*. En principio, es esencial para comprometer la integridad de las uniones estrechas entre las células del epitelio respiratorio humano y también induce la producción de IL-6 en dichas células (Bassinet *et al.*, 2004; Hasan *et al.*, 2018). Además, es capaz de inducir la apoptosis en células fagocíticas *in vitro* e *in vivo*, probablemente por la depleción de ATP, así como también de inhibir la fagocitosis, la quimiotaxis y la generación de superóxido (Vojtova, Kamanova and Sebo, 2006). Adicionalmente, la ACT modula la respuesta inmune del hospedador actuando sobre distintos tipos de células del sistema inmune y afectando la producción de citoquinas. En células dendríticas y en macrófagos la ACT en presencia de LPS estimula la producción de IL-6 y de la citoquina IL-10 mientras inhibe la producción de IL-12, TNF- α y de la quimioquina CCL3 (Vojtova, Kamanova and Sebo, 2006). Por otro lado, la ACT actúa en sinergia con el SST3 para modular a las células dendríticas a un estado semi-maduro, mediante la estimulación de la producción de IL-10 y PGE₂, lo que da lugar a una respuesta T regulatoria (Skinner *et al.*, 2004). Asimismo, la ACT coopera con el SST3 para que macrófagos infectados induzcan la producción de IL-17 y de citoquinas antiinflamatorias por parte de células T y así dirigir una respuesta Th17 (Siciliano, Skinner and Yuk, 2006).

Resulta interesante que, mientras *B. pertussis* y *B. parapertussis* tienen muy conservada la región que se une a CD11b/CD18, *B. bronchiseptica* muestra más variabilidad en la región, lo cual podría relacionarse con la variedad de huéspedes que puede infectar (Chenal-Francisque *et al.*, 2009). Además, se han reportado cepas de *B. bronchiseptica* que no producen ACT, a diferencia de las otras especies de las clásicas *Bordetella*, lo cual sugiere que ésta podría ser prescindible en alguna etapa del ciclo infeccioso de *B. bronchiseptica* durante una infección crónica (Guiso, 2017).

Sistema de secreción tipo III

Otro factor de virulencia muy distribuido en bacterias Gram negativas es el sistema de secreción tipo III (SST3). El SST3 es un sistema que permite a la bacteria translocar proteínas efectoras directamente al citoplasma de las células eucariotas a través de la membrana plasmática mediante una estructura de inyección con forma de aguja. Las proteínas efectoras translocadas alteran las cascadas de señalización de la célula huésped afectando numerosos procesos celulares. En términos generales, el aparato de inyección de este sistema se encuentra conservado entre las bacterias de distintos géneros, pero las proteínas efectoras varían ampliamente entre especies.

Bordetella spp. codifica un SST3 similar al de *Yersinia pestis* (Yuk, Harvill and Miller, 1998). Los genes del aparato de secreción, de las proteínas secretadas y sus chaperonas constituyen el locus *bsc* mientras que el locus *btr* está compuesto por genes que codifican proteínas regulatorias. Ambos loci se encuentran conservados en las clásicas *Bordetellas*.

Se han descrito varias proteínas, así como numerosos factores externos que regulan la expresión y el funcionamiento de este sistema. Por ejemplo, se ha visto que las cepas de laboratorio de *B. pertussis* no expresan el SST3, mientras que los aislamientos clínicos sí lo hacen (Fennelly *et al.*, 2008). Esto se debe probablemente a algún tipo de regulación que se manifiesta durante el cultivo *in vitro* dado que sucesivos pasajes en el laboratorio de aislamientos que expresan el SST3 inducen la inhibición de su expresión (M. E. Gaillard *et al.*, 2011). En forma contraria, el pasaje de dichas cepas por animales revierte el fenotipo hacia la expresión del SST3. Un trabajo publicado recientemente demuestra que cuando *B. pertussis* se cultiva en presencia de agentes reductores, como es el caso del ácido ascórbico presente en el medio SS, expresa y secreta en menor cantidad las proteínas secretoras del SST3 respecto al medio SS formulado sin ácido ascórbico (Goto *et al.*, 2020). Por otra parte, la evidencia acumulada hasta el momento indica que *B. bronchiseptica* expresa el SST3 durante la fase virulenta de la bacteria, *in vitro* e *in vivo*, y por ello el SST3 de *B. bronchiseptica* ha sido el más estudiado dentro de *Bordetella* spp.

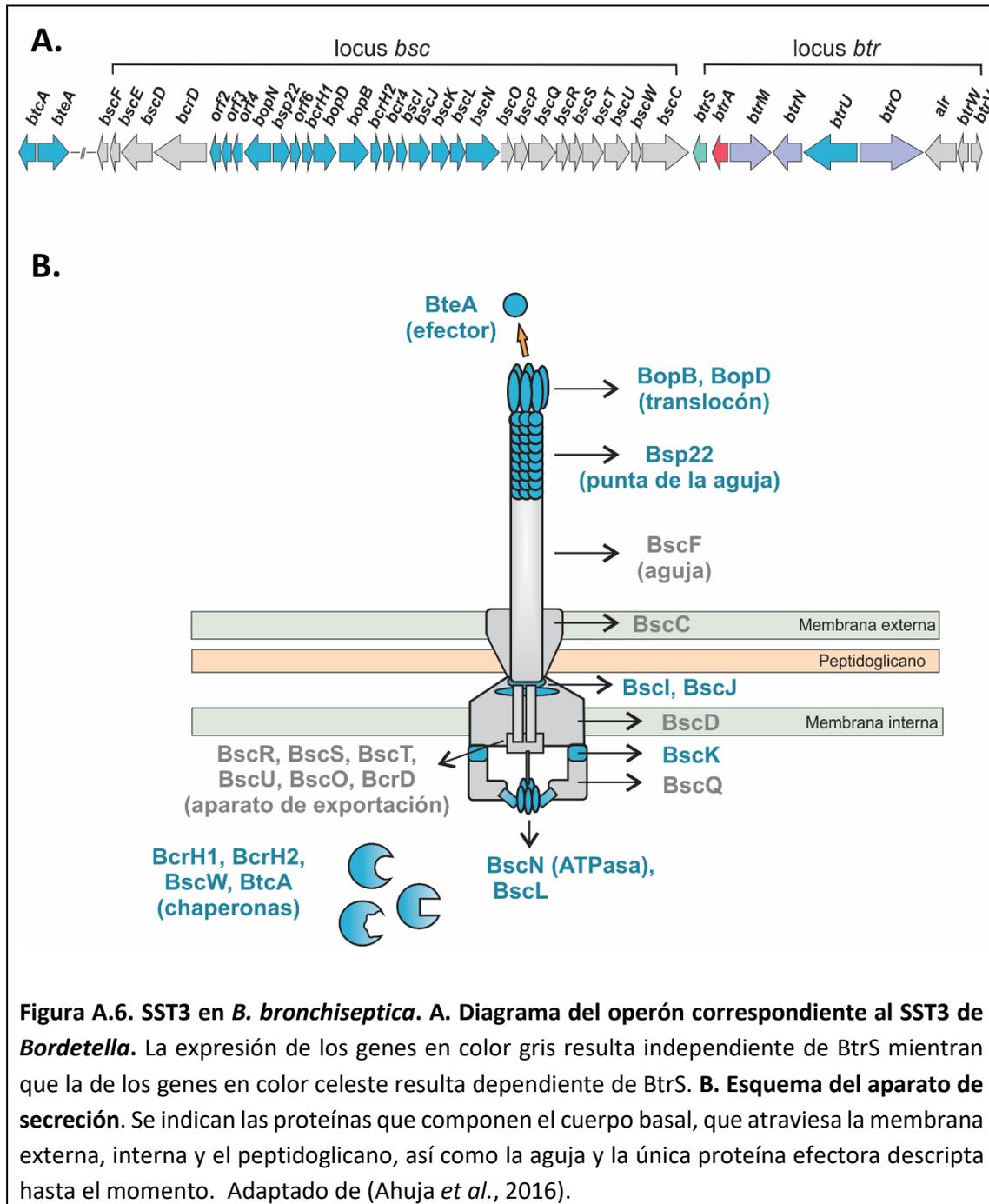
Dentro de los factores externos que influyen en la expresión de este sistema se ha descrito que el hierro es capaz de regular la expresión del SST3 de *B. bronchiseptica* (Kurushima, Kuwae and Abe, 2012b). La presencia de hierro en los medios de cultivo inhibe la expresión del SST3 mientras que muy bajas concentraciones de hierro, como las que se encuentra la bacteria durante la infección, permiten su expresión. Además, la expresión del SST3 de *B. bronchiseptica* se encuentra incrementada tras su incubación con suero ovino y también cuando se cultiva con 5% CO₂ (Hester *et al.*, 2012; Gestal *et al.*, 2018). Por el contrario, la expresión del SST3 de *B. pertussis* se encuentra disminuida en aquellas bacterias recuperadas del interior de macrófagos (Petráčková *et al.*, 2020).

Con respecto a los propios reguladores de *Bordetella* que afectan la expresión y el funcionamiento del SST3 se destacan el sistema BvgAS, la chaperona Hfq y el factor sigma de función extracitoplasmática BtrS (Yuk, Harvill and Miller, 1998; Dienstbier *et al.*, 2019). También se han identificado otras proteínas que regulan su expresión, como BtrU, BtrV y BtrW, presentes en el locus *btr* e involucradas en el ciclo de fosforilación/desfosforilación que regulan la secreción a través del sistema. El factor sigma BtrS regula positivamente la transcripción de algunos genes en ambos loci, mientras otros genes se transcriben de manera independiente de

él. A su vez, la actividad de BtrS se encuentra regulada por un factor anti-sigma denominado BtrA que actúa como su antagonista (Ahuja *et al.*, 2016).

En los sobrenadantes de cultivo de *B. bronchiseptica* pueden encontrarse cuatro proteínas del SST3: BopB, BopD, BopN y Bsp22. BopB y BopD son ortólogos de YopB y YopD de *Yersinia*, y componen el aparato de translocación, mientras que BopN, ortóloga de YopN, es una proteína efectora. Bsp22 resulta la proteína secretada más abundante pero no cuenta con ortólogos en ninguna especie fuera del género *Bordetella*. Esta proteína única se ubica en la punta de la aguja de inyección y es absolutamente necesaria para los efectos del SST3 tanto *in vitro* como *in vivo* (Ming Huam *et al.*, 2000). Además, Bsp22 tiene capacidad inmunoprotectora tanto *in vitro* como *in vivo* contra *B. bronchiseptica* pero no contra *B. pertussis* (Medhekar *et al.*, 2009; Villarino Romero *et al.*, 2013). BteA es la única proteína efectora de *B. bronchiseptica* secretada por el SST3 y es necesaria y suficiente para que la actividad citotóxica *in vitro* (Panina *et al.*, 2005).

A continuación, se presenta un diagrama de la organización de los loci *bsc* y *btr*, así como un esquema del aparato de secreción de SST3 (Figura A.6).



Ensayos *in vitro* revelaron que *B. bronchiseptica* resulta citotóxica contra distintas líneas celulares, entre las que se incluyen células epiteliales y fagocíticas, mediante un mecanismo dependiente del SST3 (Yuk, Harvill and Miller, 1998). De hecho, las células del sistema inmune que infiltran en el pulmón durante la infección sufren de apoptosis cuando la bacteria expresa un SST3 intacto pero no así en cuando la bacteria es deficiente en el sistema (Ming Huam *et al.*, 2000). Además de ser necesario para inducir la apoptosis, el SST3 actúa como un agente inmunosupresor. Se ha descrito que inhibe la traslocación del factor de transcripción NF- κ B al

núcleo de las células huésped y que estimula la producción de la citoquina inmunosupresora IL-10 (Abe, Nagamatsu and Watanabe, 2008).

Yuk y colaboradores demostraron que el SST3 de *B. bronchiseptica* contribuye a la persistencia en la colonización de la tráquea en ratones y ratas. En un ensayo de colonización a largo plazo en ratas se observó que una cepa deficiente en *bscN*, que codifica para la ATPasa del SST3, no es capaz de sobrevivir hasta el día 35 post-infección en la tráquea de los animales mientras que la cepa *wild type* sí, a pesar de que a tiempos más cortos ambas cepas colonizan tráquea y nariz de manera indistinguible (Yuk, Harvill and Miller, 1998). En concordancia con este resultado, cuando se evaluó en un modelo de infección en dos cepas de ratones (C57BL/6 y BALB/c) la capacidad de persistir de dos mutantes deficientes en el SST3, $\Delta bscN$ y $\Delta bsp22$, se determinó que ambas cepas presentaban dificultades en la colonización a largo plazo (Ming Huam *et al.*, 2000).

Otras toxinas

Citotoxina traqueal

La citotoxina traqueal de *Bordetella* spp. es la principal toxina que causa citopatología en células ciliadas epiteliales (Mattoo *et al.*, 2001). Se compone por un fragmento de peptidoglicano que en vez de ser reciclado por la célula como hace *E. coli*, es secretado al medio (Rosenthal *et al.*, 1987). Por lo tanto, su producción es el resultado del crecimiento normal de la bacteria y no depende del funcionamiento del sistema BvgAS. Esta toxina induce su toxicidad por un mecanismo indirecto ya que induce la producción de IL-1 α , la cual activa a la enzima óxido nítrico sintasa y genera un aumento desmesurado de óxido nítrico en la célula eucariota (Nixon Heiss *et al.*, 1994).

Toxina dermonecrótica

La toxina dermonecrótica (DNT) es una proteína citoplasmática de 140 kDa, termolábil, que causa lesiones necróticas en ratones de laboratorio al ser inyectada como proteína purificada por vía intradérmica (Mattoo *et al.*, 2001). Estudios *in vitro* con una línea celular de osteoblastos demostraron que DNT de *B. bronchiseptica* es capaz de inducir dramáticos cambios morfológicos y perjudicar los procesos de diferenciación y proliferación celular (Horiguchi, nakai and Kume, 1991; Horiguchi, Sugimoto and Matsuda, 1993). En estudios *in vivo* se observó que *B. bronchiseptica* precisa expresar DNT para poder alcanzar altos niveles de colonización y causar lesiones en la cavidad nasal de cerdos (Brockmeier *et al.*, 2002). No obstante, en un modelo de

infección en ratones la ausencia de DNT no afecta la virulencia de *B. bronchiseptica* ni de *B. pertussis* (Brockmeier *et al.*, 2002).

c. Factores de avirulencia

Así como existen factores que se expresan únicamente en fase virulenta, las clásicas *Bordetellas* sintetizan una serie de factores que se expresan únicamente en fase avirulenta. A éstos se los denomina factores de avirulencia. Los genes que codifican para este tipo de proteínas se encuentran reprimidos cuando el sistema BvgAS está activo y se los conoce como *vrgs*. Dado que la fase virulenta de la bacteria es necesaria y suficiente para el establecimiento de la infección por *Bordetella* spp. y que poco se sabe de la implicancia de la fase avirulenta en su ciclo de vida, los factores de avirulencia han sido poco estudiados.

La mayor parte de estos genes se ha identificado a partir de la caracterización de bacterias cultivadas en presencia o ausencia de moduladores, o bien de cepas bloqueadas en fase virulenta o avirulenta. Algunos de estos genes están presentes en las tres *Bordetellas* clásicas, mientras otras están presentes en algunas especies. Por último, existen factores de avirulencia específicos de cada especie. *VraA* y *VraB* son dos proteínas de superficie encontradas únicamente en *B. pertussis* en fase avirulenta (Stenson and Peppler, 1995); el alcalígeno es un sideróforo sintetizado por las tres clásicas *Bordetellas* que sólo está bajo la regulación del sistema BvgAS en algunas cepas de *B. bronchiseptica* (Giardina *et al.*, 1995), y por último, el flagelo es el principal factor de avirulencia de *B. bronchiseptica*, aunque los genes flagelares están en el genoma de las tres especies (Akerley *et al.*, 1992).

Estudios ómicos de los últimos 15 años, realizados principalmente en cepas de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica*, han revelado numerosos genes que presentan un mayor nivel de expresión cuando el sistema BvgAS está inactivo (Cummings *et al.*, 2006; Nicholson, 2007; Moon *et al.*, 2017; Coutte *et al.*, 2020). En concordancia con la capacidad de *B. bronchiseptica* de sobrevivir en ambientes con limitación de nutrientes en fase avirulenta, una gran parte de estos genes están involucrados en procesos metabólicos.

A continuación, se presentará una breve descripción de los factores de avirulencia más caracterizados de *Bordetella* spp.

Virulence-repressed genes (vrgs)

Knapp y Mekalanos fueron los primeros en reportar la existencia de cinco genes cuyos niveles de expresión aumentaban en presencia de moduladores (Knapp and Mekalanos, 1988). Con el objetivo de identificar genes regulados por el sistema BvgAS (conocido como *vir* en aquel entonces), construyeron mutantes con la inserción del transposón TnpA en el genoma de *B. pertussis* y evaluaron cuáles tenían actividad fosfatasa alcalina en presencia y ausencia de MgSO₄ y ácido nicotínico. Los mutantes que presentaron mayor actividad en presencia de los moduladores que en su ausencia contenían la inserción en genes *vrgs* y se los denominó *vrg-6*, *vrg-18*, *vrg-24*, *vrg-53* y *vrg-73*. Adicionalmente, corroboraron que dichos genes estaban regulados por el sistema BvgAS al evaluar la actividad fosfatasa alcalina de los mutantes en una cepa bloqueada en fase avirulenta.

A pesar de haber sido identificados, estos cinco *vrgs* apenas han sido estudiados y no están anotados como tales en el genoma de *B. pertussis*, a excepción de *vrg-6*. En un principio, se reportó que *vrg-6* era necesario durante el proceso de infección ya que un mutante de *B. pertussis* con una inserción en el gen *vrg-6* colonizaba los pulmones y la tráquea de ratones de una manera menos eficiente que la cepa *wild type* (Beattie, Shahin and Mekalanos, 1991). No obstante, un estudio posterior en el que se utilizó un mutante de *B. pertussis* obtenido por deleción limpia de *vrg-6*, realizado por Martínez de Tejada y colaboradores, demostró lo contrario. Este estudio reveló que dicha cepa era capaz de persistir en el tracto respiratorio de ratones, durante los 35 días post infección analizados, de manera indistinguible de la cepa *wild type* (Martínez de Tejada *et al.*, 1998b). En este trabajo además evaluaron los niveles de expresión de *vrg-6 in vivo* con un sistema reportero y determinaron que la expresión de *vrg-6* no está inducida durante el proceso de infección de *B. pertussis*. Estos resultados indicaron que *vrg-6* no es requerido durante la infección con *B. pertussis* y sugirieron que los resultados obtenidos en el primer estudio podían deberse a efectos polares de la inserción del transposón, o bien, a una mutación en otro locus.

Los cinco genes *vrgs* descritos están presentes en los genomas de *B. pertussis* Tohama I, *B. bronchiseptica* RB50 y *B. parapertussis* 12822 (Tabla A.1).

Tabla A.1. Vrgs presentes en los genomas de las clásicas *Bordetellas*.

<i>vrg</i>	<i>B. pertussis</i> Tohama I	<i>B. bronchiseptica</i> RB50	<i>B. parapertussis</i> 12822
<i>Vrg-6</i>	BP2486	BB3906	BPP3456
<i>Vrg-18</i>	BP0874	BB1558	BPP2161
<i>Vrg-24</i>	BP3501	BB0968	BPP0874
<i>Vrg-53</i>	BP3324	BB4107	BPP3672
<i>Vrg-73</i>	BP3280	BB4613	BPP4143

Ureasa

La ureasa es una enzima que cataliza la conversión de urea en amonio y carbamato, el cual se disocia espontáneamente en otra molécula de amonio y ácido carbónico. La ureasa de *Bordetella* se compone por tres subunidades (UreA, UreB y UreC) y requiere de níquel en su sitio activo. *Bordetella* además expresa cuatro proteínas accesorias, involucradas en la asimilación del níquel (UreD, UreE, UreF y UreG), y una proteína (UreJ), cuya función se desconoce pero que podría estar involucrada en el transporte de níquel. El cluster de los genes de la ureasa está compuesto por un operón *ureAJBC*, un operón *ureEF*, los genes *ureD*, *ureG* y *bbuR* (McMillan, Mau and Walker, 1998). *BbuR* es un factor transcripcional de la familia LysR que regula negativamente la expresión de la ureasa (McMillan *et al.*, 1996).

B. bronchiseptica presenta actividad ureasa cuando la bacteria se cultiva en un medio a 37°C en presencia de MgSO₄ 40 mM. Sin embargo, a 30°C no presenta actividad inclusive en presencia de MgSO₄ (McMillan *et al.*, 1996). Esto sugiere la presencia de un segundo regulador de la expresión de la ureasa, dependiente de la temperatura. No obstante, un mutante $\Delta bvgS$ bloqueado en fase avirulenta presenta actividad ureasa en todas las condiciones. Esto puede deberse a que, si bien la transcripción de *BvgA* disminuye sensiblemente a bajas temperaturas, *BvgA* no se transcribe cuando se adiciona MgSO₄ al medio de cultivo. El hecho de que la ureasa se exprese a 37°C podría sugerir que cumple un rol durante la infección. En un modelo de infección mixta en cobayos, una cepa de *B. bronchiseptica* sin actividad ureasa logró un mayor nivel de colonización en el tracto respiratorio que la cepa parental (Monack and Falkow, 1993), mientras que en un ensayo en ratones cepas de *B. bronchiseptica* con o sin actividad ureasa presentaron cinéticas de colonización similares (McMillan *et al.*, 1999). Posteriormente, estudios de invasión en células HeLa demostraron que durante las primeras 4 horas de infección las bacterias que carecían de ureasa sobrevivían menos dentro de las células en comparación con las bacterias *wild type*. Esto sugiere que la ureasa es requerida durante el proceso de invasión celular y/o en los primeros estadios de sobrevivencia intracelular, probablemente

incrementando el pH del fagosoma gracias a la producción de amonio (McMillan *et al.*, 1996). En el mismo estudio observaron que tras 24 horas de infección se recuperaron de las células HeLa más bacterias deficientes en ureasa que con actividad ureasa, en concordancia con el estudio hecho en cobayos. Sin embargo, cuando se agregó urea al medio de cultivo de las células HeLa la diferencia en la supervivencia intracelular entre estas desapareció, por lo que, en presencia de mayores concentraciones de urea, la expresión de ureasa sería beneficiosa (McMillan *et al.*, 1996).

Sideróforo alcalígeno

Los sideróforos son compuestos quelantes de hierro sintetizados por un gran número de bacterias patógenas. El hierro es un cofactor esencial en muchas reacciones biológicas y dado que dentro del huésped se encuentra unido a lactoferrina o transferrina, las bacterias deben sintetizar este tipo de compuestos para obtener hierro. *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* producen el mismo sideróforo alcalígeno frente a condiciones de baja disponibilidad de hierro y los genes necesarios para su síntesis están codificados en el operón *alcABCDEF* (Moore *et al.*, 1995; Kang *et al.*, 1996; Pradel, Guiso and Loch, 1998). La regulación de este sistema difiere entre estas especies. En el caso de *B. pertussis*, la producción de alcalígeno es independiente del sistema BvgAS (Gorringe, Woods and Robinson, 1990). Por el contrario, algunas cepas de *B. bronchiseptica* expresan este sideróforo cuando el sistema BvgAS está inactivo mientras que otras cepas son insensibles a la regulación mediada por BvgAS (Giardina *et al.*, 1995). En cuanto al rol del alcalígeno *in vivo*, en un ensayo de colonización en cerdos se observó que una cepa de *B. bronchiseptica* que no producía alcalígeno presentaba una virulencia atenuada respecto a la cepa parental, la cual pertenecía al cluster que sintetiza alcalígeno de manera independiente a BvgAS (Register *et al.*, 2001).

Flagelo

El flagelo es una estructura filamentosa que le aporta a la bacteria la capacidad de moverse hacia ambientes con condiciones más favorables. Este rasgo es una gran ventaja tanto para bacterias patógenas como para bacterias simbióticas y aunque existen distintos tipos de movilidad, la mediada por flagelo es la más común entre las bacterias y se la denomina movilidad de tipo nado. El flagelo no contribuye únicamente a la movilidad, sino que también cumple roles centrales en otros fenotipos como la adhesión bacteriana, la formación de biofilm y la modulación de la respuesta inmune durante una infección (Haiko and Westerlund-Wikström, 2013).

Hasta el 2019 se consideraba que el flagelo era un *vrg* expresado exclusivamente por *B. bronchiseptica*, pero en el laboratorio de Erik Hewlett observaron que algunas cepas de *B. pertussis* eran capaces de sintetizar una estructura tipo flagelo y nadar en agar blando, aunque se desconocen las condiciones en las que esto sucede naturalmente y su implicancia en la infección (Hoffman *et al.*, 2019).

B. bronchiseptica comparte la estructura del flagelo y parte de su regulación con las bacterias Gram negativas flageladas. La estructura flagelar es una maquinaria macromolecular, compuesta por casi 30 proteínas estructurales, que consta de un cuerpo basal, un gancho y un filamento (Chaban, Hughes and Beeby, 2015). El cuerpo basal está formado por un cilindro y dos pares de anillos, uno exterior y otro interior, que anclan la estructura a las membranas. Los dos anillos exteriores, denominados L y P, se encuentran en la membrana externa y en el peptidoglicano, mientras que los dos anillos interiores, denominados S y M, se encuentran en el espacio periplasmático y en la membrana plasmática. El cuerpo basal además de brindar soporte incluye las proteínas implicadas en el mecanismo de rotación del flagelo. Este motor obtiene la energía necesaria para su funcionamiento gracias al flujo de protones a través de la membrana plasmática. El gancho, por su parte, es una estructura curvada y corta que conecta el cuerpo basal con el filamento. Por último, el filamento es un tubo hueco con forma helicoidal compuesto por subunidades de flagelina.

El aparato flagelar es un sistema que se autoensambla: comienza secuencialmente desde la parte citoplasmática y termina con la región distal del filamento. El correcto ensamblaje depende tanto de la regulación transcripcional como post-traducciona l de los componentes de la estructura ya que éstos deben transportarse en el orden correcto a través del canal del cuerpo basal (Osterman *et al.*, 2015). Es interesante destacar que tanto la base en donde se asienta el flagelo como el mecanismo por el cual es armado el flagelo es muy similar estructuralmente al SST3 (Johnson *et al.*, 2019). Se desconoce si este fenómeno es producto de divergencia evolutiva de un ancestro común o de convergencia evolutiva de estructuras similares. De todas maneras, es posible suponer que podrían existir regulaciones compartidas entre ambos sistemas.

La organización temporal del armado del flagelo se logra gracias a que los genes que median el ensamblaje y el funcionamiento del flagelo se encuentran organizados en múltiples operones, integrados por cerca de 50 genes. Estos operones tienen una organización jerárquica (clase I, II y III), de manera que la expresión de los operones de una clase determina la expresión de los operones de la siguiente clase.

El proceso comienza con la expresión de los genes *flhD* y *flhC* que pertenecen al operón de primera clase *flhDC* y cuyos productos génicos conforman el regulador maestro flagelar FlhD₄C₂. La transcripción de este operón responde a numerosas señales, que dependen de la especie bacteriana en cuestión, y además se ve afectada por un factor sigma 70. El complejo FlhD₄C₂ activa los promotores sigma 70- dependientes de los operones clase II. Éstos codifican para los componentes estructurales de los anillos, del cuerpo basal, del gancho; para los sustratos de transportación flagelar tempranos y sus chaperonas; y para algunas proteínas regulatorias, como el factor sigma, FliA. Una vez finalizado el ensamblaje del cuerpo basal y del gancho, el factor sigma codificado por *fliA* inicia la expresión de los operones clase III, entre los cuales se encuentra el gen de la flagelina y de las proteínas necesarias para el funcionamiento del motor flagelar así como las de quimiotaxis (Osterman *et al.*, 2015).

Los primeros estudios enfocados en la movilidad y el flagelo de *Bordetella* fueron llevados adelante por Akerley y Miller quienes, a comienzos de la década de 1990, reportaron que la movilidad de *B. bronchiseptica* y la síntesis del flagelo están reguladas negativamente por el sistema BvgAS (Akerley *et al.*, 1992). Imágenes de microscopía electrónica de transmisión que obtuvieron de *B. bronchiseptica* cultivada en presencia de MgSO₄ o de mutantes bloqueadas en fase avirulenta revelaron la presencia de unos pocos flagelos, con disposición peritrica, alrededor de las bacterias. Los polipéptidos que identificaron a partir de la purificación de los filamentos flagelares tenían un peso molecular de 40 kDa y la secuencia aminoacídica de su extremo N-terminal presentaba un alto grado de similitud con las flagelinas de *Salmonella typhimurium* y de *E. coli* (Akerley *et al.*, 1992).

Luego, el mismo grupo identificó el gen correspondiente a la flagelina de *Bordetella*, *flaA*, y observaron que este gen también está presente en *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. avium*, aunque las primeras dos especies no lo expresen (Akerley and Miller, 1993). A diferencia de lo que ocurre en otras bacterias como *S. typhimurium*, *flaA* es el único gen que codifica para una flagelina en *Bordetella* (Parkhill *et al.*, 2003). En cuanto a la regulación, inicialmente demostraron que la represión por parte del sistema BvgAS sobre la flagelina ocurre a nivel transcripcional y luego pusieron en evidencia la semejanza entre el sistema regulatorio del flagelo en *Bordetella* y la cascada regulatoria conocida en *E. coli* y *S. typhimurium*. De esta manera, identificaron un locus, *fliA*, que resulta homólogo al compuesto por *flhD* y *flhC* de *E. coli*, así como un posible sitio de unión de un factor sigma alternativo, *fliA*. En este trabajo, ellos proponen que, considerando que el promotor de *flaA* no tiene sitio de unión para BvgA, la regulación por parte de BvgAS tiene lugar sobre *fliA* y/o el factor sigma *fliA*.

Continuando con esta línea de trabajo, Akerley y colaboradores demostraron que la transcripción del locus *frl* ocurría cuando el sistema BvgAS se encontraba inactivo y construyeron una cepa que expresaba ectópicamente el flagelo en la fase virulenta de la bacteria. Para obtener esta cepa, denominada *frl^R* (por revertante), colocaron al locus *frl* bajo un promotor activado por BvgAS, como el de *fhaB* (Akerley, Cotter and Miller, 1995). De esta manera disponían de una cepa de *B. bronchiseptica* que expresaba en su fase virulenta al flagelo y era capaz de nadar. Luego, procedieron a estudiar el rol del flagelo durante el proceso infeccioso en un huésped natural. Para ello, inocularon ratas con una cepa *wild type*, con un mutante deficiente en el locus *frl* y con la cepa que expresa ectópicamente el locus *frl* durante la fase virulenta (*frl^R*) y evaluaron su persistencia en el tracto respiratorio durante 26 días. Mientras que el número de bacterias recuperadas correspondientes a la cepa deficiente en *frl* resultó indistinguible al de la cepa *wild type*, el número de bacterias viables correspondientes a la cepa *frl^R* recuperadas de las muestras de tráquea fue significativamente menor al de la cepa *wild type* a los 15 y 26 días post-infección. Para corroborar que la colonización defectuosa de las tráqueas se debía a la presencia del flagelo, realizaron el mismo ensayo con una cepa *frl^R* deficiente en *flaA* y observaron que su capacidad de colonización era comparable con la de la cepa *wild type*. De esta manera, concluyeron que la expresión ectópica del flagelo en *B. bronchiseptica* resulta perjudicial para la correcta colonización del tracto respiratorio de las ratas. Por otro lado, analizaron los sueros obtenidos de ratas infectadas con *B. bronchiseptica wild type* y con la cepa *frl^R* y observaron que únicamente el suero obtenido tras la infección con *frl^R* reconocía a la flagelina. La ausencia de anticuerpos que detecten flagelina sugiere que la cepa *wild type* no expresa el flagelo durante la infección en los tiempos y condiciones evaluadas, aunque no es posible descartar que lo haga en otro nicho o en otro estadio de infección. Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente por Cotter y Miller, quienes indicaron que el suero de conejos infectados una cepa *wild type* de *B. bronchiseptica* no posee anticuerpos anti-flagelina (Cotter and Miller, 1994). En el mismo sentido, durante el trabajo de Tesis de la Dra. Fernández se pudo observar que ratones infectados con una cepa deficiente en el gen *flaA* (sin flagelo y sin movilidad) era capaz de persistir en el animal por más tiempo que la cepa *wild type* (Fernandez, 2004).

Estos resultados, sumado a la ausencia de evidencia en ese momento de que *B. pertussis* presentara movilidad, desviaron la atención sobre un posible rol del flagelo en el proceso de infección de *Bordetella*. Sin embargo, estudios recientes sugieren que es necesario revisar el rol de este sistema.

Por su parte, la flagelina es un componente bacteriano que provoca una fuerte respuesta proinflamatoria en distintas células eucariotas y que además puede modular la respuesta inmune. Induce la producción de IL-8 y la síntesis de óxido nítrico, así como estimula la migración transepitelial de neutrófilos y la expresión de genes asociados a la defensa inmune innata en células epiteliales (López-Boado, Cobb and Deora, 2005). Además, la flagelina puede desencadenar la respuesta inmune adaptativa al estimular la secreción de quimioquinas, la migración y maduración de células dendríticas, así como la activación de células T. De hecho, la flagelina resulta el principal ligando del receptor tipo Toll 5 (TLR-5) (Hayashi *et al.*, 2001). En conclusión, la detección de flagelina por parte del huésped induce la producción de factores involucrados en el reclutamiento de fagocitos profesionales y de células presentadoras de antígeno, en la síntesis de moléculas antimicrobianas y de mediadores inflamatorios.

López-Boado y colaboradores evaluaron la capacidad de la flagelina de *B. bronchiseptica* de inducir una respuesta inmune *in vitro* (López-Boado, Cobb and Deora, 2005). Para ello expusieron distintas líneas celulares a una cepa de *B. bronchiseptica wild type*, a una cepa bloqueada en fase avirulenta (que expresa flagelo), a una cepa bloqueada en fase virulenta deficiente en *flaA* y a la cepa que expresa *fli* en fase virulenta. Detectaron una mayor concentración de la citoquina IL-8 y de la quimioquina MIP-3 α en los sobrenadantes de las células estimuladas con bacterias flageladas que en los de las células estimuladas con bacterias no flageladas (López-Boado, Cobb and Deora, 2005). Además, en este trabajo corroboraron que la flagelina de *B. bronchiseptica* es reconocida por células que expresan TLR-5.

3. BvgR

a. Antecedentes

Como se mencionó con anterioridad, existe una clase de genes conocidos como *vrgs* cuya expresión está reprimida durante la fase virulenta de la bacteria. Estos genes han sido poco caracterizados ya que no parecen jugar un rol importante en la infección, pero se especula que podrían estar involucrados durante el proceso de transmisión o en la sobrevivencia de la bacteria en el ambiente.

Con el objetivo de identificar la proteína que media la represión de los *vrgs*, Merkel y colaboradores construyeron una biblioteca de mutantes por transposición con mini-Tn5 en una cepa de *B. pertussis* (Merkel and Stibitz, 1995). Cinco mutantes de esta biblioteca presentaron

expresión constitutiva de *vrgs*, pero regulación tipo *wild type* sobre factores de virulencia. Las cinco mutaciones se ubicaron en una misma región genómica, adyacente al gen *bvgS*. En ella encontraron tres ORFs posibles, pero sólo uno de ellos, que codificaba para una proteína de 23 kDa, presentaba homología con otras proteínas de *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* y *E. coli*. A este locus lo denominaron *bvgR* por *Bordetella virulence gene repression*.

Posteriormente, el mismo grupo publicó un trabajo en el que identificó y caracterizó el gen *bvgR* más en profundidad (Merkel, Barros and Stibitz, 1998). Dado que inicialmente las secuencias nucleotídicas publicadas de la región de *bvgAS* presentaban numerosos errores, el ORF identificado previamente era erróneo. En este trabajo establecieron el ORF correcto del gen *bvgR* a partir de una nueva secuenciación y además corroboraron su activación por parte de BvgA. Cuando compararon la secuencia aminoacídica de BvgR, con un peso molecular predicho de 32 kDa, con las bases de datos encontraron regiones altamente conservadas en proteínas de función desconocida presentes en patógenos como *S. typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, entre otros. Hoy en día, a dicha secuencia aminoacídica conservada se la asocia al dominio EAL (Römling, Galperin and Gomelsky, 2013).

En un trabajo posterior los mismos autores analizaron más en profundidad la expresión del gen *bvgR* (Merkel *et al.*, 2003). Mediante ensayos de *northern blot* detectaron transcritos correspondientes a *bvgR* en *B. pertussis* cuando ésta se cultivó en ausencia de MgSO₄, pero los autores recalcaron que la intensidad de la banda correspondiente al transcrita de *bvgR* era mucho menor a la de otros transcritos y que mostraba signos de degradación. Además de identificar que la región compuesta por los 164 pb río arriba del 5' del transcrita de *bvgR* son necesarios para su transcripción, los autores demostraron que la transcripción sólo ocurre en presencia de BvgA fosforilada y que esta proteína se une directamente a la región promotora. Por último, observaron que el promotor de BvgR presenta el mismo patrón de expresión que el promotor de *fhaB*, es decir que permanece activo inclusive en altas concentraciones del modulador. Por lo tanto, en presencia de BvgA fosforilada *bvgR* se transcribe en altos niveles en fase virulenta y teniendo en cuenta el resultado de *northern blot*, el transcrita sería inestable y rápidamente degradado (Merkel *et al.*, 2003).

En 1998 se publicaron dos trabajos en los que se estudió la implicancia de BvgR en el proceso de infección de *B. pertussis* en ratones. En ambos trabajos los autores concluyeron que la inapropiada expresión de uno o más genes reprimidos por BvgR interfieren con la capacidad de *B. pertussis* de causar enfermedad (Martinez de Tejada *et al.*, 1998b; Merkel *et al.*, 1998). Martinez de Tejada y colaboradores estudiaron la relevancia de las fases virulenta y avirulenta

durante el proceso de infección de *B. pertussis* y de manera complementaria estudiaron la relevancia de los *vrgs* con un mutante delecional en *bvgR* y en *vrg-6*. Sus resultados estuvieron en sintonía con lo anteriormente publicado. Observaron que durante el periodo evaluado de 35 días la fase virulenta es necesaria y suficiente para producir la infección, pero no así la fase avirulenta, ya que la cepa bloqueada en fase avirulenta no fue recuperada a partir del día 6 post-infección. Con respecto a los *vrgs*, si bien la cepa que no expresaba *vrg-6* mostró un patrón de colonización similar a la cepa *wild type*, la cepa mutante en *bvgR* fue recuperada en menor proporción en la tráquea y en los pulmones respecto a la cepa *wild type* a los 11 días post-infección. Esta diferencia indica que la represión de alguno de los factores regulados por BvgR es necesaria durante la infección. Otro aspecto interesante de este trabajo es que cuando evaluaron la expresión de *vrg-6* en la cepa $\Delta bvgR$ observaron una menor expresión en esta cepa en fase virulenta que en fase avirulenta, lo que sugiere que BvgR reprime parcialmente la expresión de *vrg-6* (Martinez de Tejada *et al.*, 1998b).

En el segundo estudio, llevado adelante por Merkel y colaboradores, se estudió el rol de BvgR a través de un modelo de infección por aerosol en ratones. En este ensayo se evaluó el nivel de colonización de pulmones y tráqueas, la leucocitosis inducida y la tasa de supervivencia durante 21 días. Para el ensayo se utilizaron cuatro cepas: una cepa de *B. pertussis wild type*, una cepa bloqueada en fase virulenta (*bvgSC*), una cepa con el gen *bvgR* delecionado ($\Delta bvgR$) y una cepa bloqueada en fase virulenta que además tenía el gen *bvgR* delecionado (*bvgSC* $\Delta bvgR$). A pesar de que no pudieron determinar diferencias significativas en los niveles de colonización a los 14 días post-infección entre los distintos grupos debido a la alta variación entre los datos recuperados, sí resultó evidente la diferencia en la tasa de supervivencia. Mientras que para el día 21 post-infección el 100% de los ratones infectados con la cepa *wild type* y las dos cepas bloqueadas en fase virulenta murieron, el 55% de los ratones infectados con $\Delta bvgR$ sobrevivieron. Más aun, cuando se analizaron los niveles de leucocitos en sangre 14 días post-infección se vio que los ratones infectados con la cepa $\Delta bvgR$ presentaron un nivel de leucocitosis significativamente menor que los ratones infectados con las otras tres cepas. Los autores de este trabajo concluyeron que la inapropiada expresión de uno o más *vrgs* interfieren con la habilidad de *B. pertussis* para desarrollar la enfermedad pero que la expresión constitutiva de los *vags* compensaba el defecto causado por los *vrgs* no reprimidos en la cepa *bvgSC* $\Delta bvgR$ (Merkel *et al.*, 1998).

En lo que respecta a *B. bronchiseptica*, la Dra. Fernández evaluó la importancia de la expresión de *vrgs* para la virulencia de la bacteria utilizando una cepa que presentaba el gen

bvgR interrumpido (*BbbvgR*), así como su capacidad de interactuar con células del huésped (Fernández *et al.*, 2005). Durante el ensayo de infección llevado adelante en dicho trabajo los ratones fueron inoculados por vía intranasal con 5×10^5 UFC de la cepa *wild type* o *BbbvgR* y luego se determinaron los niveles de colonización en los pulmones. Bajo este modelo de infección ambas cepas colonizaron los pulmones en igual medida y fueron eliminadas para el día 55 post-infección. Además, tanto la adherencia a células epiteliales de pulmón como la supervivencia intracelular de la cepa *BbbvgR* resultaron indistinguibles a la de la cepa *wild type*. Por último, en el mismo trabajo observaron en una corrida electroforética la presencia de flagelina y de otros polipéptidos en la muestra de *BbbvgR* que estaban ausentes en la muestra de la cepa *wild type*. Por lo tanto, *BvgR* regula no sólo el flagelo de *B. bronchiseptica* sino la expresión de otros polipéptidos.

4. Regulación mediada por el segundo mensajero c-di-GMP

a. Conceptos generales

El bis (3'-5') monofosfato de guanosina cíclico, diguanilato cíclico o c-di-GMP es una molécula soluble que funciona como segundo mensajero en bacterias. El c-di-GMP está involucrado en la regulación de numerosos procesos celulares, como la transición entre los estilos de vida planctónico móvil y biofilm, la virulencia, la progresión del ciclo celular y la resistencia a estreses. El concepto más amplio respecto al rol del c-di-GMP en bacterias plantea que altos niveles de c-di-GMP promueven un estilo de vida sésil, asociado a la formación de biofilm y al establecimiento de infecciones crónicas, mientras que bajos niveles de c-di-GMP aumentan la movilidad y la virulencia bacteriana. No obstante, el avance en los estudios sobre este segundo mensajero deja en claro que esta es una mirada simplista y que la regulación mediada por el c-di-GMP es más compleja (Jenal, Reinders and Lori, 2017).

La molécula de c-di-GMP es un dinucleótido cíclico compuesto por dos residuos de guanosin monofosfato unidos por enlaces 3'-5' fosfodiéster. Los niveles intracelulares de c-di-GMP dependen de las actividades antagonistas de dos tipos de enzimas: aquellas que lo sintetizan, denominadas diguanilato ciclasas (DGC), y aquellas que lo degradan, denominadas fosfodiesterasas específicas de c-di-GMP (PDE) (Jenal and Malone, 2006).

Las DGC presentan dominios GGDEF que son necesarios para su actividad y cuyo nombre hace referencia a los aminoácidos conservados en el sitio activo de la enzima. No obstante, la

sustitución de la tercera posición de la secuencia aminoacídica, que corresponde a un residuo de aspartato, por un residuo de glutamato también resulta en una proteína catalíticamente activa (GGDEF → GGEEF). El mecanismo de síntesis llevado adelante por las DGC requiere la dimerización de estos dominios. El c-di-GMP se sintetiza a partir de dos moléculas de GTP, cada una unida al sitio activo de un monómero, que se condensan para producir una molécula de c-di-GMP y dos moléculas de pirofosfato. Su mecanismo de catálisis es similar al de las adenilato ciclasas y las polimerasas, con las cuales además comparte rasgos estructurales. Adicionalmente, las DGCs se encuentran bajo regulación alostérica ya que la unión de c-di-GMP a un sitio secundario inhibe su actividad. El control por producto previene el consumo excesivo de GTP y amortigua las variaciones estocásticas de los niveles intracelulares de c-di-GMP (Jenal, Reinders and Lori, 2017).

Por su parte, la actividad fosfodiesterasa de las enzimas que degradan específicamente c-di-GMP está asociada a dos clases de dominios: EAL o HD-GYP. Las proteínas con dominio EAL linealizan el c-di-GMP en 5'pGpG y aunque también sean capaces de degradar este producto, es probable que no contribuyan fisiológicamente a su degradación debido a que su velocidad de hidrólisis es muy lenta. En cambio, el 5'pGpG es escindido en dos moléculas de GMP por fosfodiesterasas no específicas. El mecanismo de catálisis de las proteínas con dominio EAL requiere la unión de Mg^{+2} o Mn^{+2} a su sitio activo para coordinar dos moléculas de agua, una de las cuales realiza el ataque hidrolítico a la unión fosfodiéster de la molécula de c-di-GMP. Ambos metales son esenciales para la actividad de las PDE, pero su actividad se ve eficazmente inhibida por la unión de Ca^{+2} y Zn^{+2} (Römling, Galperin and Gomelsky, 2013). Los dominios EAL pueden ser catalíticamente activos en su forma monomérica, aunque numerosos ensayos *in vitro* han puesto en evidencia que la dimerización incrementa su actividad, por lo que es probable que sea la conformación de mayor relevancia *in vivo* (Rao *et al.*, 2009). Se ha descrito que un *loop* flexible (el *loop* 6) es importante para la dimerización de los dominios EAL en algunas proteínas (Rao *et al.*, 2009). En el sitio activo de las PDE con dominio EAL se encuentran conservados ciertos residuos claves para la unión del sustrato, para la coordinación de los iones metálicos y aquellos presentes en el *loop* 6, los cuales permiten diferenciar las fosfodiesterasas catalíticamente activas de las inactivas basándose en su secuencia aminoacídica (Rao *et al.*, 2009; Römling, Liang and Dow, 2017). Entre estos, se destaca el glutamato que da origen a la denominación del dominio (E-A-L) ya que está directamente involucrado en la coordinación de uno de los iones metálicos y se encuentra conservado en el 100% de las enzimas activas (Tamayo, Tischler and Camilli, 2005; Rao *et al.*, 2008; Tchigvintsev *et al.*, 2010).

El otro dominio identificado capaz de degradar c-di-GMP es el dominio HD-GYP. Este dominio pertenece a la superfamilia HD, cuyos miembros poseen actividades hidrolíticas contra distintos sustratos y que presentan conservados los residuos de histidina y aspartato que dan origen al nombre (HD) (Römling, Liang and Dow, 2017). Inicialmente se predijo que los dominios HD-GYP presentaban actividad fosfodiesterasa específica para c-di-GMP por la alta frecuencia con la que se los encuentran en proteínas unidos a dominios GGDEF.

Posteriormente, se comprobó que dos proteínas de *P. aeruginosa*, PA4108 y PA4781 con dominios HD-GYP, eran capaces de degradar c-di-GMP y que su producto final es GMP, a diferencia de lo que ocurre en la degradación por parte de los dominios EAL (Ryan *et al.*, 2009). Estudios realizados con otra proteína con dominio HD-GYP, RpfG, demostraron que la actividad fosfodiesterasa es dependiente del motivo HD, ya que la sustitución de alguno de estos residuos por una alanina produce la pérdida de la actividad. Por el contrario, la sustitución de algún residuo del motivo GYP por alanina no afecta la actividad fosfodiesterasa pero sí su capacidad de interactuar con dos proteínas GGDEF para regular la movilidad mediada por pili (Ryan *et al.*, 2010).

El esquema a continuación representa la síntesis y degradación del c-di-GMP y además se incluyen los distintos fenotipos que han sido reportados bajo su regulación (Figura A.7).

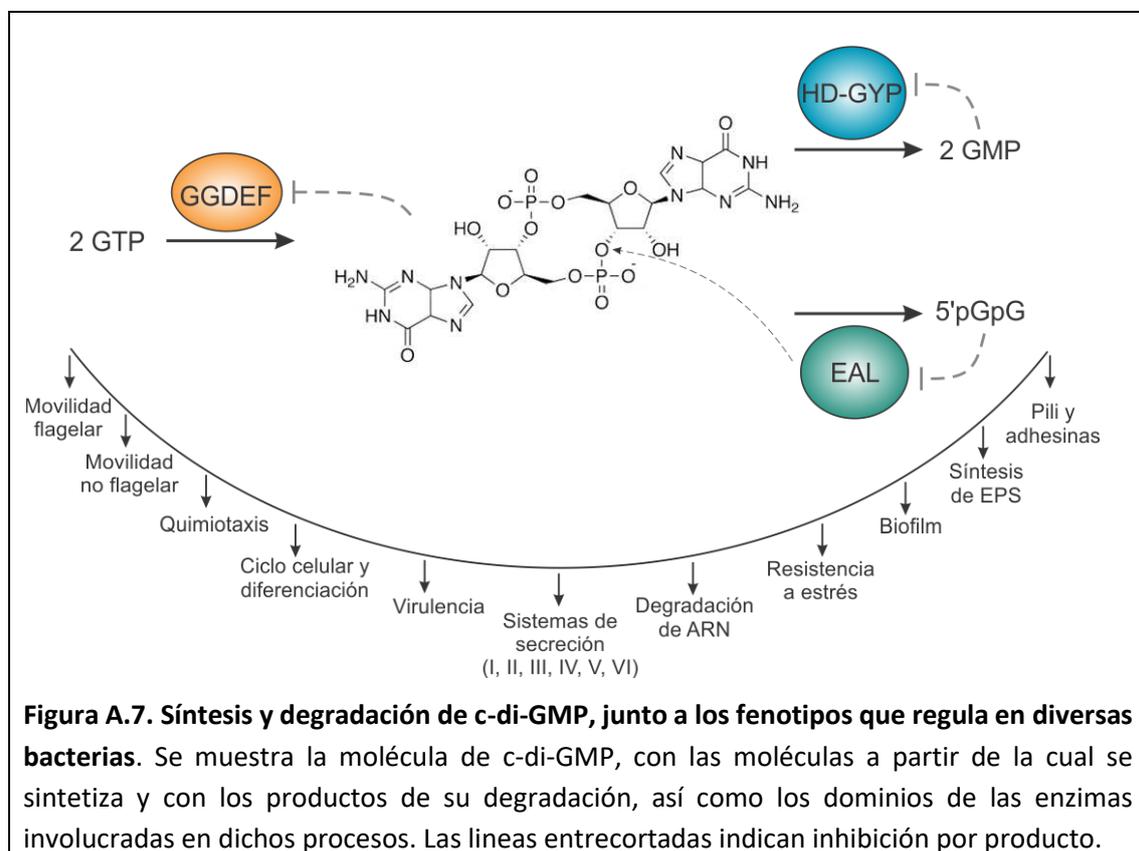


Figura A.7. Síntesis y degradación de c-di-GMP, junto a los fenotipos que regula en diversas bacterias. Se muestra la molécula de c-di-GMP, con las moléculas a partir de la cual se sintetiza y con los productos de su degradación, así como los dominios de las enzimas involucradas en dichos procesos. Las líneas entrecortadas indican inhibición por producto.

El secuenciamiento masivo de genomas develó que los dominios GGDEF, EAL y HD-GYP son casi ubicuos en bacterias, encontrándose más distribuidos dentro de las bacterias Gram negativas que de las Gram positivas. Sin embargo, el número de genes que codifican para este tipo de proteínas es altamente variable según la especie. Un grupo pequeño de especies no codifica para ninguna DGC o PDE de c-di-GMP, como *Helicobacter pylori* o *M. haemolytica*; otro grupo más abundante, codifica para un número intermedio de proteínas con dominios GGDEF y EAL, como es el caso de *E. coli* y *S. typhimurium* que presentan un promedio de 29 y 20 genes, respectivamente; otras especies, como las del género *Vibrio*, codifican hasta 100 genes de este sistema. En particular, las proteínas con dominio HD-GYP son menos abundantes e inclusive están ausentes en varias especies. El hecho de que exista multiplicidad de proteínas con dominios GGDEF y EAL en una especie indica que el sistema de señalización mediado por c-di-GMP es más flexible que el mediado por otros segundos mensajeros que cuentan con menos componentes.

Gran parte de los dominios GGDEF, EAL y HD-GYP están unidos covalentemente a otro dominio en su extremo N-terminal, el cual actúa como dominio sensor (Hengge, 2009). Los dominios acompañantes más distribuidos son REC, PAS y GAF. Estos dominios pueden ubicarse en la membrana externa, en el espacio periplasmático (en bacterias Gram negativas) o en el citoplasma celular por lo que la variedad de señales a detectar es muy amplia. De esta manera, las señales celulares y ambientales que integran el sistema de señalización mediado por c-di-GMP son muy diversas. Entre ellas se incluye el oxígeno, el estado redox, la luz, la hambruna, ciertos tipos de iones, sustancias extracelulares como antibióticos o moléculas de señalización inter e intracelulares (Hengge, 2009). Inclusive, estas enzimas pueden estar combinadas con un dominio REC y de esta manera, formar parte de un sistema de dos componentes (Chen *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012). Asimismo, es usual encontrar proteínas con dominios GGDEF fusionados a dominios EAL o HD-GYP. Ensayos *in vivo* e *in vitro* demostraron que estas proteínas compuestas suelen tener una u otra actividad, debido a que uno de los dominios se encuentra degenerado y actúa como regulador alostérico (Hengge, 2009). Sin embargo, también existen algunas pocas enzimas bifuncionales, es decir que son capaces de ejercer ambos tipos de actividad enzimática aunque no en simultáneo (Römling, Galperin and Gomelsky, 2013). Adicionalmente, se pueden encontrar proteínas con dominios GGDEF o EAL sin otros dominios acompañantes, a las cuales se las denomina *stand-alone* GGDEF y *stand alone* EAL (Mouali *et al.*, 2017; Römling, Liang and Dow, 2017). Mientras que es poco frecuente encontrar proteínas *stand-alone* GGDEF ya que los dominios GGDEF requieren de otro dominio para dimerizarse y

tener actividad, un séptimo de las proteínas con dominio EAL en la base de dato Pfam están anotadas como *stand alone* EAL.

b. Mecanismos de regulación mediada por c-di-GMP

En términos generales, la regulación mediada por los segundos mensajeros consta de cuatro componentes: dos correspondientes a las enzimas que los sintetizan y los degradan, uno que corresponde a la molécula efectora capaz de unir al segundo mensajero y cuya actividad está regulada alostéricamente por el mismo y por último, un componente *target* que interactúa directamente con la molécula efectora para llevar adelante un determinado proceso a nivel molecular.

En orden de ejecutar una determinada función el c-di-GMP debe unirse a un efector, alterar su estructura y permitir que la estructura adquirida cumpla con su actividad. Los componentes efectores que sensan c-di-GMP son muy variados ya que la molécula de c-di-GMP es muy flexible y por ende no puede definirse un único dominio o un único sitio de unión a c-di-GMP. No obstante, se han descrito algunas familias de componentes efectores. En primera instancia, los componentes efectores se pueden separar en proteínas y en moléculas de ARN. Dado que el c-di-GMP constituye en sí una molécula de ARN, ésta puede actuar como un ligando en riboswitches y así regular la expresión de proteínas (McKee, Harvest and Tamayo, 2018). Respecto a las proteínas efectoras, hasta el momento se han descrito cuatro familias. La más estudiada es la familia de las proteínas con dominio PilZ, el cual suele estar unido a otros dominios encargados de llevar adelante una función molecular. Generalmente, las proteínas con dominio PilZ tras unirse al c-di-GMP y cambiar su conformación, ejercen su función a través de interacciones proteína-proteína (Hou *et al.*, 2020). Las otras tres familias de proteínas efectoras descritas hasta el momento están representadas por el factor de transcripción FleQ de *P. aeruginosa*, PelD de *P. aeruginosa* y por proteínas con dominios GGDEF cuyo sitio activo está degenerado pero su sitio I está intacto, como PopA en *Caulobacter crescentus* (Lee *et al.*, 2007; Hickman and Harwood, 2008; Ozaki *et al.*, 2014).

Por otro lado, los componentes *target* y los procesos que controlan los efectores de c-di-GMP varían tanto como los componentes efectores y pueden ubicarse en distintos niveles de regulación de los procesos celulares. En primera instancia, el c-di-GMP puede afectar la transcripción de un determinado grupo de genes, como por ejemplo el factor de transcripción FleQ de *P. aeruginosa* que activa la expresión de los genes flagelares y los sistemas de DGC-PDE, YdaM-YciR e YegE-YhjH, que regulan la expresión del operón *csgDEFG* correspondiente al curli

de *E. coli* (Pesavento *et al.*, 2008a). Adicionalmente, la transcripción puede ser regulada mediante la unión de c-di-GMP a riboswitches ubicados en la región 5' UTR de los ARNm (Hengge, 2009). Por otra parte, las proteínas efectoras que unen c-di-GMP pueden además tener actividad enzimática en los dominios que no unen c-di-GMP, como es el caso de la celulosa sintasa BcsA que presenta un dominio PilZ (Weinhouse *et al.*, 1997).

Alternativamente, el c-di-GMP puede regular el funcionamiento de estructuras celulares, como el cuerpo basal del flagelo. Por ejemplo, las proteínas YcgR y DgrA con dominio PilZ de *E. coli* y *C. crescentus* regulan la movilidad bacteriana sin modificar la expresión de los genes flagelares sino interfiriendo de manera directa con la función motora del cuerpo flagelar, probablemente por su interacción con componentes citoplasmáticos del complejo flagelar (Ryjenkov *et al.*, 2006; Christen *et al.*, 2007). Otro ejemplo es la interacción de la proteína efectora PopA de *C. crescentus* con el regulador del ciclo celular CtrA, el cual queda secuestrado y es posteriormente degradado por la proteasa ClpXP (Smith *et al.*, 2014).

Todos estos ejemplos demuestran que los mecanismos moleculares regulados por c-di-GMP son extremadamente variados ya que existen numerosos tipos de efectores que unen c-di-GMP y estos pueden actuar controlando prácticamente cualquier tipo de mecanismo molecular dentro de la célula. Esto permite que la regulación dada por este segundo mensajero sea altamente variada.

Un concepto clave para entender la regulación mediada por c-di-GMP es que tanto la concentración efectiva de c-di-GMP en la célula como la afinidad de los componentes efectores de c-di-GMP son importantes para que se dé un proceso celular determinado. Asimismo, la concentración efectiva de c-di-GMP dentro de la célula no es necesariamente la misma que la concentración total de c-di-GMP, dado que una fracción de este segundo mensajero puede encontrarse unido a proteínas, generando zonas dentro de la célula con mayor concentración de c-di-GMP que la concentración difusible libremente (Hengge, 2009).

Sin embargo, no todas las DGC ni todas las PDE contribuyen sustancialmente al pool de c-di-GMP celular ni afectan todos los fenotipos regulados por este segundo mensajero. Esto es posible ya que no todas estas proteínas están presentes y activas en el mismo lugar y al mismo tiempo, sino que actúan en módulos, lo cual permite que el sistema sea específico y elimina el ruido estocástico. Varios autores han propuesto que dichos módulos de control de c-di-GMP están determinados por un secuestro del tipo temporal y/o espacial (Hengge, 2009).

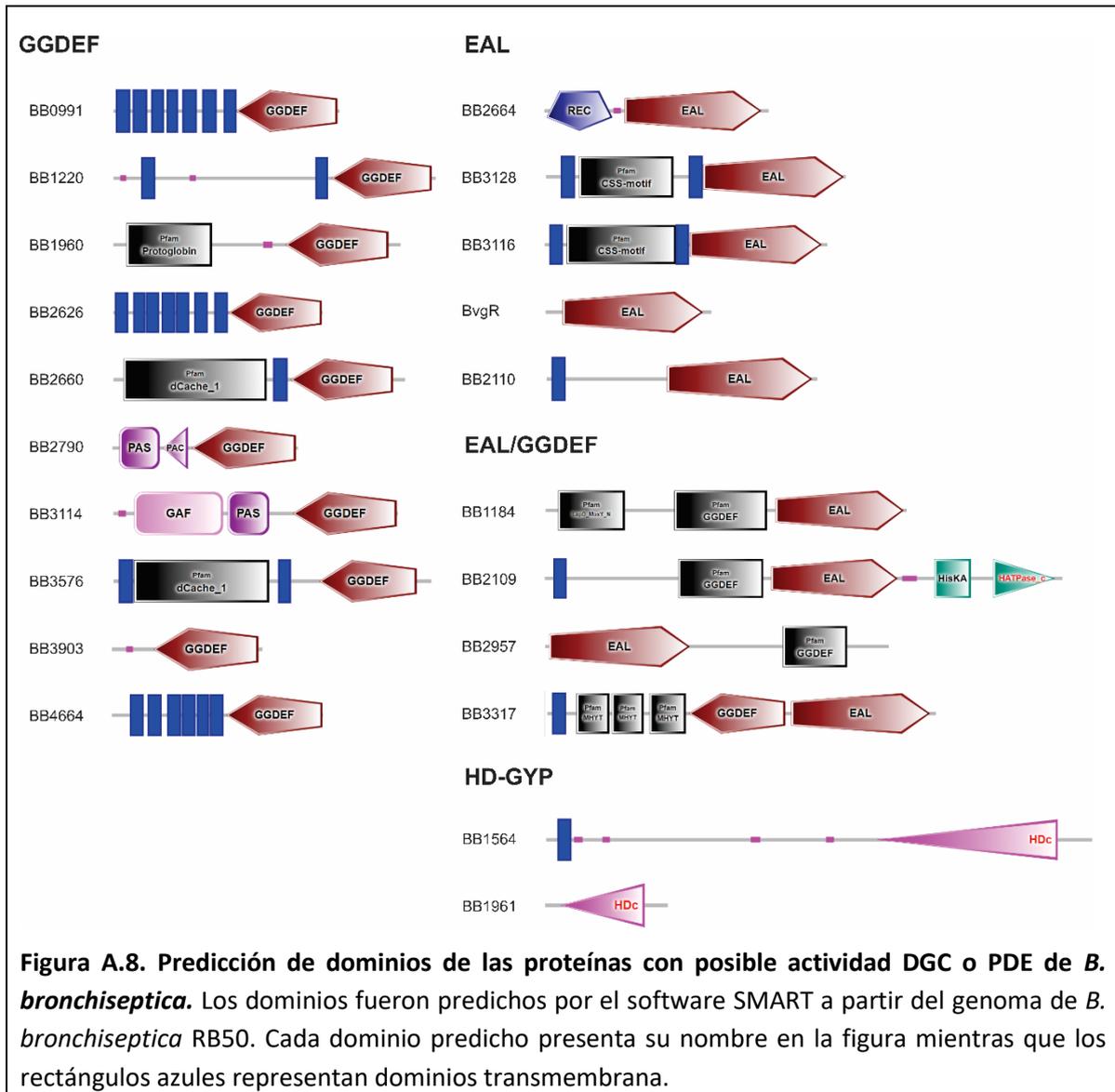
El secuestro temporal se basa en la precisa regulación de la expresión y de la proteólisis de los módulos de control de c-di-GMP, de manera que las proteínas con dominios GGDEF y EAL, así como las proteínas efectoras que unen a c-di-GMP y los componentes *target* se encuentran co-reguladas. Por ejemplo, la PDE YhjH y la proteína efectora YcgR de *E. coli*, que regulan la movilidad, se encuentran bajo el control indirecto del regulador maestro flagelar FlhDC, por lo que están co-reguladas con el flagelo (Hengge, 2009).

El secuestro espacial, por su parte, sugiere que la señalización de c-di-GMP ocurre dentro de micro compartimientos. Esto implica que una determinada DGC o PDE conforma un complejo multiprotéico junto a una proteína efectora y/o a un componente *target*, a través de interacciones proteína-proteína o proteína-DNA. Dado que los componentes involucrados están estrechamente asociados, la concentración local de c-di-GMP puede variar y determinar la acción de proteínas efectoras lindantes sin modificar sustancialmente el pool de c-di-GMP a nivel celular. Por lo tanto, el secuestro espacial permite la co-existencia de módulos funcionales en una misma célula, los cuales responden a niveles locales de c-di-GMP y regulan de manera específica distintos fenotipos.

Existe evidencia experimental que demuestra que el secuestro espacial ocurre. Un ejemplo es el caso del sistema Lap de *P. fluorescences* en el que LapD, que es una proteína de membrana con un dominio EAL degenerado que une c-di-GMP, que interactúa directamente con una DGC anclada a membrana, GcbC (Dahlstrom *et al.*, 2015). En este sistema GcbC le suministra c-di-GMP a LapD, que secuestra a la proteasa LapG y permite que la adhesina LapA sea retenida en la membrana (Newell *et al.*, 2011), contribuyendo así a la formación de biofilm.

c. C-di-GMP en *Bordetella*

En los genomas de las clásicas *Bordetellas* pueden encontrarse numerosos genes que podrían codificar para DGCs o PDEs específicas de c-di-GMP, lo cual sugiere que este segundo mensajero cumple un rol en la regulación de algunos fenotipos en estas bacterias. Por ejemplo, el genoma de *B. bronchiseptica* RB50 presenta 10 genes que codifican para proteínas con un dominio GGDEF, 4 genes que codifican para proteínas duales con dominios GGDEF-EAL, 5 genes que codifican para proteínas con dominio EAL y 2 para proteínas con dominio HD-GYP (Figura A.8). Por su parte, el genoma de *B. pertussis* Tohama I presenta 5 genes que codifican para proteínas con dominio GGDEF, 3 genes que codifican para proteínas duales GGDEF-EAL, 1 gen que codifica para una proteína con dominio EAL y otro para una proteína con dominio HD-GYP.



El primer reporte acerca de una proteína involucrada en el metabolismo del c-di-GMP en el género *Bordetella* fue publicado por Wan y colaboradores en 2009. Ellos estudiaron una proteína de *B. pertussis* que tiene un dominio DGC y un dominio globina, a la que denominaron BpeGReg (Wan *et al.*, 2009). Esta proteína con actividad DGC es capaz de sensor oxígeno y contribuye a la formación de biofilm de *B. pertussis*, dado que una cepa deficiente en *bpeGReg* presentó una menor capacidad de adherirse a superficies abióticas que la cepa parental.

Nuestro laboratorio describió por primera vez que tanto la movilidad como la formación de biofilm son fenotipos regulados por c-di-GMP en *B. bronchiseptica* (Sisti *et al.*, 2013). Se observaron diferencias en dichos fenotipos al sobreexpresar una DGC y una PDE, ambas funcionales, de *P. aeruginosa*. Asimismo, demostraron que una proteína con dominio GGDEF de

B. bronchiseptica (BB3576) es capaz de disminuir la movilidad de la bacteria en fase virulenta y de incrementar la formación de biofilm en fase intermedia cuando es sobreexpresada desde un plásmido (Sisti *et al.*, 2013).

Estudios realizados más adelante por nuestro grupo revelaron que la proteína BB3576, renombrada BdcA (*Bordetella diguanylate cyclase A*), tiene efectivamente actividad DGC ya que su sobreexpresión en *B. bronchiseptica* produjo un aumento del c-di-GMP celular mientras que la delección de *bdcA* resultó en una disminución en la concentración de c-di-GMP (Belhart *et al.*, 2019). Asimismo, cuando se mutó el sitio activo GGDEF de BdcA por GGAAF no se observó el aumento en la formación de biofilm característico de la sobreexpresión de *bdcA*, aunque la delección de *bdcA* no afectó los niveles de biofilm formados por *B. bronchiseptica*. En el mismo trabajo se corroboró que la inhibición de la movilidad por parte de BdcA ocurre a nivel transcripcional, ya que la sobreexpresión de *bdcA* disminuyó la síntesis de flagelina inclusive en una cepa bloqueada en fase avirulenta. En este sentido, evaluamos qué proteínas efectoras podían intervenir en la regulación mediada por BdcA. Tras descartar dos proteínas efectoras anteriormente estudiadas en nuestro laboratorio, una proteína PilZ y la proteína LapD, encontramos mediante análisis bioinformáticos a una proteína que presenta dominios GGDEF y EAL degenerados, junto a un dominio histidina quinasa. En ausencia de esta proteína, BB2109, BdcA sintetizó niveles más bajos de c-di-GMP que cuando esta proteína está presente y por ende, BdcA fue incapaz de inhibir la movilidad y de estimular la formación de biofilm.

Ensayos de infección por vía intranasal en ratones utilizando bajas dosis de desafío demostraron que la cepa deficiente en *bdcA* necesita una dosis mayor que la cepa *wild type* para lograr colonizar los animales, sugiriendo que esta proteína cumpliría un rol en las primeras etapas de la infección de *B. bronchiseptica*.

Por otro lado, con el objetivo de determinar qué proteínas están reguladas por el c-di-GMP en *B. bronchiseptica* manipulamos artificialmente los niveles de este segundo mensajero sobreexpresando una DGC (BdcA) y una PDE (BB2664) de *B. bronchiseptica*, cuyas actividades fueron previamente comprobadas, y realizamos estudios proteómicos y transcriptómicos (Manuscrito en preparación). En términos generales, encontramos numerosas proteínas reguladas por c-di-GMP en *B. bronchiseptica* relacionadas con el metabolismo de aminoácidos y del ácido nicotínico, con el estrés oxidativo, con el plegamiento de proteínas y con factores de virulencia. Resultó interesante encontrar que en la condición de alto nivel de c-di-GMP el SST3 de *B. bronchiseptica* estaba reprimido a nivel transcripcional. Ensayos de citotoxicidad en la línea celular de macrófagos murinos J774.A revelaron que la cepa de *B. bronchiseptica* con altos

niveles de c-di-GMP (Bb-*pbdC*) resultó menos citotóxica que la cepa parental. En este sentido, dicha cepa también presentó una virulencia atenuada en un modelo de infección murino, dado que se recuperaron menos bacterias viables del tracto respiratorio de los animales infectados durante los primeros 7 días post infección en comparación con la cepa *wild type*. Asimismo, la respuesta inmune de los animales infectados con Bb-*pbdC* fue más débil que la de los animales infectados con la cepa *wild type*, ya que reclutó una menor cantidad de neutrófilos al sitio de la infección y estimuló una menor secreción de citoquinas proinflamatorias. Este resultado concuerda con los reportes en otras bacterias, en las que altos niveles de c-di-GMP correlacionan con una disminución en la virulencia de la bacteria.

En conclusión, el segundo mensajero c-di-GMP resulta un factor relevante en la regulación de distintos fenotipos de las bacterias del género *Bordetella*, habiéndose descrito hasta el momento su implicancia en la movilidad, la formación de biofilm y la virulencia de estas bacterias.

5. Biofilm

En los inicios de la Microbiología se consideraba que las bacterias eran microorganismos que flotaban o nadaban libremente en soluciones acuosas y durante muchos años el estudio de las características fisiológicas de las bacterias se llevó adelante exclusivamente en cultivos líquidos. Sin embargo, este tipo de crecimiento no representa el modo de vida que dichos microorganismos exhiben en la naturaleza. En la publicación de 1978 titulada “*How bacteria stick*” de Costerton y colaboradores se detallan las distintas situaciones en las que, hasta aquel momento, se habían descrito bacterias creciendo adheridas a superficies, como piedras sumergidas en agua o dientes, formando microcolonias o films (películas) y cubiertas en un glicocálix de fibras (Costerton, Geesey and Cheng, 1978). Actualmente a este tipo de crecimiento alternativo al planctónico lo denominamos biofilm y sabemos que está ampliamente distribuido en la naturaleza, no únicamente en bacterias, sino también en arqueas, protozoos, algas y hongos (Callow and Callow, 2006).

Los biofilms pueden definirse como comunidades de microorganismos adheridos a una superficie rodeados por una matriz polimérica que presentan rasgos diferentes a sus pares planctónicos. Los biofilms pueden estar constituidos por una o más especies y pueden establecerse sobre superficies tanto bióticas como abióticas. En términos generales, los biofilms mixtos predominan en nichos ambientales mientras que los biofilms compuestos por una única

especie están asociados con diversas infecciones y son motivo de gran preocupación en centros de salud y en industrias, siendo los patógenos más relevantes en este sentido *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *E. coli*, *V. cholerae* y *Staphylococcus aureus* (O'Toole, Kaplan and Kolter, 2000). No obstante, también pueden encontrarse biofilms compuestos por más de una especie durante las infecciones (Short, Murdoch and Ryan, 2014).

Dentro de un biofilm las bacterias se encuentran inmersas en una matriz que ellas mismas producen y que puede llegar a representar el 90% de la biomasa del biofilm. Si bien la composición exacta de la matriz depende de la especie bacteriana en cuestión, suele estar constituida de exopolisacáridos (EPS), proteínas de adhesión, enzimas y ADN extracelular (Rabin *et al.*, 2015). Los componentes estructurales de la matriz dan lugar a la formación de una estructura robusta y compleja atravesada por canales que permiten el flujo de agua, aire, nutrientes y otras moléculas. Al mismo tiempo, la matriz protege a la biomasa de procesos físicos como la desecación o la radiación UV y de agentes dañinos como los antibióticos, predadores como protozoos o componentes del sistema inmune de un huésped durante una infección. De hecho, se reportó que las células en biofilm son 1000 veces más tolerantes a ciertos antibióticos que las células planctónicas (Kostakioti, Hadjifrangiskou and Hultgren, 2013) y que las bacterias en biofilm pueden evadir el reconocimiento por parte de macrófagos durante una infección, atenuando la respuesta inflamatoria del huésped (Rabin *et al.*, 2015).

Durante la transición del estado planctónico al estado de biofilm las bacterias experimentan una gran cantidad de cambios a nivel transcripcional, proteómico y metabólico. Esto es producto del seguimiento de un programa celular cuidadosamente regulado. El estudio de los procesos que controlan la formación y el desarmado del biofilm ha permitido determinar que las bacterias son inducidas a adoptar uno de estos dos tipos de vida por factores externos. Estos factores son diversos y abarcan desde la presencia de nutrientes y metabolitos hasta factores bioquímicos como el pH o la temperatura (O'Toole, Kaplan and Kolter, 2000).

El desarrollo de un biofilm es un proceso secuencial que consta de cuatro etapas. La primera de ellas es la etapa de adhesión a la superficie. El acercamiento de la bacteria a la superficie puede darse por movimientos brownianos y fuerzas gravitacionales o bien, puede estar impulsado por el movimiento flagelar. El proceso de adhesión consta de dos pasos: uno reversible, en el que el flagelo y el pili tipo IV juegan un rol clave en algunas bacterias, y otro irreversible que tiene lugar cuando se empieza a secretar la matriz. La segunda etapa representa el crecimiento del biofilm y da lugar a la formación de microcolonias. Durante la tercera etapa, el biofilm sufre un proceso de maduración en el que se vuelve más voluminoso y puede adoptar

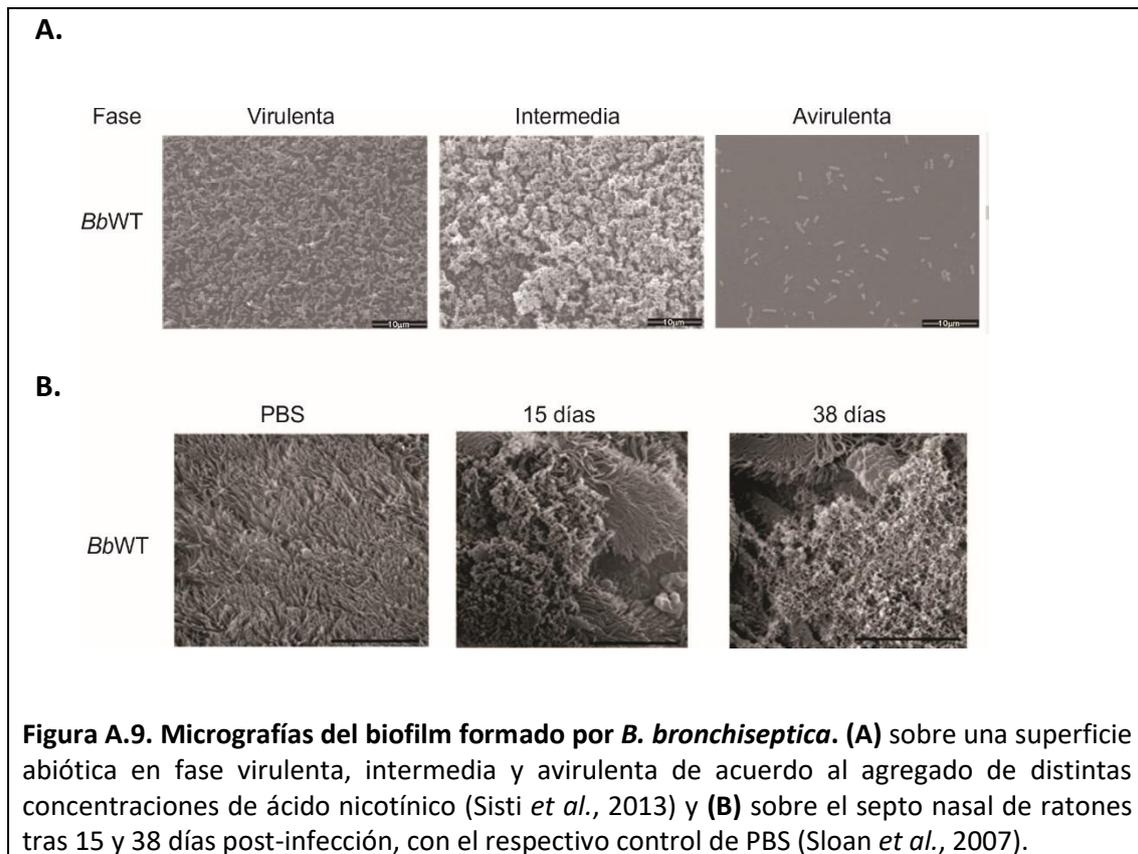
una estructura tridimensional tipo de hongo o de torre. En esta etapa es que el biofilm adquiere todos sus rasgos característicos: abundante matriz extracelular, resistencia a factores externos y una diferenciación gradual entre las bacterias de la región más interna a la más externa del biofilm. La cuarta y última etapa corresponde al proceso de desarmado, que puede ocurrir en todo el biofilm o sólo en una parte. Los factores que estimulan el desprendimiento de células de un biofilm son variados, como el déficit nutricional o una sobrepoblación. Esta etapa es crítica en este estilo de vida ya que las células desprendidas pueden colonizar nuevos ambientes. A pesar de que las etapas de formación de un biofilm se encuentran conservadas en un amplio rango de microorganismos, las vías regulatorias involucradas difieren enormemente (Kostakioti, Hadjifrangiskou and Hultgren, 2013; Tolker-Nielsen, 2015).

Los principales métodos de estudio de biofilm se realizan cultivando las bacterias sobre superficies abióticas sumergidas en un medio de cultivo líquido. Sin embargo, esta situación no es representativa de la forma en la que muchos patógenos se establecen como biofilm. En el caso de patógenos que forman biofilm sobre tejidos, los nutrientes se obtienen de la superficie a la cual se adhirieron y el biofilm se forma en la interfase aire-sólido. Por lo tanto algunos investigadores han utilizado como modelo de estudio la formación de macrocolonias sobre medio de cultivos sólidos en placas de Petri (Serra *et al.*, 2013). También se ha analizado la formación de biofilm sobre cultivos *ex vivo* de células eucariotas (Yang *et al.*, 2013). En todos los casos se ha podido analizar situaciones particulares de la formación de biofilm que, en ocasiones, escapan a los análisis realizados sobre superficies abióticas. Asimismo, durante una infección también se pueden encontrar patógenos intracelulares que forman biofilms dentro de células del huésped, como es el caso de *E. coli* uropatogénica (Kostakioti, Hadjifrangiskou and Hultgren, 2013).

a. Biofilm de *Bordetella*

Durante los últimos años, distintos grupos de investigación han demostrado que *B. bronchiseptica* y *B. pertussis* son capaces de formar biofilm tanto sobre superficies abióticas como vidrio, poliestireno y cloruro de polivinilo (PVC), así como sobre superficies bióticas, principalmente en la cavidad nasal y la tráquea de ratones infectados (Yasuhiko Irie, Mattoo and Ming H Yuk, 2004; Sloan *et al.*, 2007; Serra *et al.*, 2011; Sisti *et al.*, 2013). En la Figura A.9 se puede observar el biofilm formado por *B. bronchiseptica* sobre vidrio (panel A) y en el septo nasal de un ratón infectado (panel B)(Sloan *et al.*, 2007; Sisti *et al.*, 2013). También se demostró que los biofilms de *B. bronchiseptica* presentan mayor tolerancia en un amplio rango de

antibióticos respecto a la bacteria en estado planctónico (Mishra *et al.*, 2005).



Respecto a la participación del biofilm *in vivo*, diversos estudios han reportado que la producción de biofilm por *Bordetella* durante la infección puede contribuir a la colonización y persistencia en las vías respiratorias de los animales infectados. En el laboratorio de Deora lograron visualizar los biofilms formados en la cavidad nasal de animales infectados hasta 19 y 38 días tras la inoculación con *B. pertussis* y *B. bronchiseptica*, respectivamente (Sloan *et al.*, 2007; Conover *et al.*, 2010). Además, el hallazgo de que los aislamientos de *Bordetella* a partir de humanos o animales infectados presentan una mayor capacidad de formar biofilm es un indicio de que este fenotipo es beneficioso durante la infección (Sukumar *et al.*, 2014; Cattelan *et al.*, 2017). Más aun, el mismo grupo de trabajo planteó que las vacunas contra *Bordetella* spp. fallan a la hora de prevenir la transmisión porque las bacterias forman biofilms en la nasofaringe, lo cual las protege del sistema inmune del huésped y permite la transmisión por dispersión (Cattelan *et al.*, 2018).

De acuerdo a un ensayo transcripcional la formación de biofilm por parte de *Bordetella* spp. es fruto de un programa de expresión génica que está finamente regulado y que cambia de

acuerdo a la etapa de desarrollo en la que se encuentra el biofilm (Nicholson, Conover and Deora, 2012a). No obstante, poco se sabe de algunos de los mecanismos de regulación involucrados. El proceso de formación de biofilm está regulado, en parte, por el sistema BvgAS. *Bordetella* spp. presenta *in vitro* una mayor cantidad de biofilm formado en bacterias en fase intermedia, seguido por el formado por bacterias en fase virulenta. Las bacterias cultivadas en fase avirulenta forman la menor cantidad de biofilm, como puede verse en la Figura A.9 (Yasuhiko Irie, Mattoo and Ming H Yuk, 2004; Mishra *et al.*, 2005). No obstante, durante la formación de biofilm se requiere que factores propios de cada una de las tres fases sean expresados en el momento adecuado, así como también son importantes factores que no dependen del sistema BvgAS (Nicholson, Conover and Deora, 2012a).

Proteínas y estructuras involucradas en la formación de biofilm

El proceso de formación de biofilm es un proceso complejo y multifactorial. En el caso de *Bordetella* spp. se han identificado algunos de los factores que son importantes para su desarrollo. Como resultado de un estudio transcriptómico se demostró que los genes que componen el flagelo son expresados en el estadio más temprano del desarrollo de biofilm de *B. bronchiseptica*, pero que luego son reprimidos durante la etapa de maduración (Nicholson, Conover and Deora, 2012a). En este sentido, una cepa que carece de flagelo se adhiere a la superficie menos eficientemente que la cepa *wild type*, pero luego llega a formar biofilms igual de robustos. Por el contrario, una cepa de *B. bronchiseptica* que expresa el flagelo de manera ectópica no tiene inconvenientes en la etapa de adhesión, pero a tiempos posteriores presenta una menor cantidad de biofilm formado respecto a la cepa *wild type*.

Al igual que en otras bacterias, se ha reportado que las adhesinas que expresa *Bordetella* spp. están involucradas en el proceso de biofilm. Como se mencionó anteriormente, FHA es una adhesina cuya expresión está regulada por el sistema BvgAS y se expresa tanto durante la fase virulenta como la intermedia. Los biofilms de cepas que no expresan FHA son deficientes en la adhesión a superficies abióticas y tampoco son capaces de adquirir la estructura tridimensional típica del biofilm de *Bordetella in vitro*, ya que esta proteína debe estar presente en la membrana para mediar la adhesión entre células (Yasuhiko Irie, Mattoo and Ming H Yuk, 2004; Serra *et al.*, 2011). Asimismo, FHA tiene un rol clave durante la formación de biofilm *in vivo* ya que una cepa de *B. pertussis* deficiente en *fhaB* no logra formar un biofilm denso y con una estructura definida sobre la superficie apical de la nariz y tráquea de ratones infectados, como lo hace la cepa *wild type*, sino que únicamente forma algunos pequeños clusters de células (Serra *et al.*, 2011).

Otro conjunto de adhesinas relevantes para la formación de biofilm, específicamente durante la fase virulenta de la bacteria, son las fimbrias. Un mutante de *B. bronchiseptica* que no expresa fimbrias, $\Delta fimBCD$, presenta una menor cantidad de biofilm formado sobre una superficie abiótica respecto a la cepa *wild type* (Yasuhiko Irie, Mattoo and Ming H Yuk, 2004).

Nuestro grupo de investigación ha descrito la funcionalidad de un sistema de proteínas en *B. bronchiseptica* análogo al sistema Lap descrito en *P. fluorescens* (Ambrosis *et al.*, 2016). La principal proteína del sistema es una adhesina de gran tamaño denominada BrtA. Esta proteína pertenece a la familia de proteínas RTX y es secretada por su propio sistema de secreción tipo I (SST1) (Nishikawa *et al.*, 2016). BrtA compone junto a la proteasa periplasmática LapG y a la proteína transmembrana LapD al sistema Lap de *B. bronchiseptica*, el cual está implicado en la formación de biofilm de esta bacteria. La delección del gen *brtA* produce una disminución en la formación de biofilm de *B. bronchiseptica* en superficies abióticas, la cual se hace más evidente durante la fase intermedia de la bacteria. Cuando la proteasa LapG se encuentra libre en el espacio periplasmático cliva a BrtA y la libera de la membrana, por lo que la función de LapG es determinar la localización de BrtA. LapD, por su parte, es capaz de secuestrar a LapG y prevenir la liberación de BrtA. En un ensayo de infección en ratones la cepa que carece de la proteasa LapG, y por ende tiene mayor cantidad de BrtA en la superficie, fue recuperada en mayor proporción respecto a la cepa *wild type* en un 25% de los ratones infectados (Ambrosis *et al.*, 2016).

Otro factor regulado por el sistema BvgAS y que afecta al proceso de formación de biofilm de *Bordetella* spp. es la ACT. Esta toxina, a diferencia de las adhesinas previamente mencionadas, inhibe la formación de biofilm y aquellas cepas que no expresan ACT forman más biofilm tanto en fase virulenta como intermedia. Más aun, el biofilm formado en fase virulenta por el co-cultivo de una cepa *wild type* con una que no expresa ACT es indistinguible del formado por la cepa *wild type*, por lo que ACT de dicha cepa sería capaz de inhibir la formación de biofilm de la cepa mutante (Y. Irie, Mattoo and Yuk, 2004). El perfil de biofilm obtenido sugiere que la inhibición por parte de ACT está mediada, por lo menos parcialmente, por su interacción con FHA. Dado que ACT no se expresa durante la fase intermedia de la bacteria, mientras que FHA sí lo hace, podría explicar por qué la formación de biofilm es óptima en esta fase (Yasuhiko Irie, Mattoo and Ming H. Yuk, 2004). Estos resultados fueron corroborados a nivel molecular en un trabajo más reciente. Hoffman y colaboradores describieron que la ACT inhibe la formación de biofilm cuando su dominio AC interactúa de manera directa con el dominio C-terminal maduro de la FHA e interfiere con la propiedad de adhesión de esta última (Hoffman *et al.*, 2017).

Por otro lado, y en concordancia con la definición de biofilm, la composición de la matriz de *Bordetella* spp. incluye exopolisacáridos y ADN extracelular (Parise *et al.*, 2007; Conover, Mishra and Deora, 2011). Estos dos factores se expresan de manera independiente del sistema de regulación BvgAS y aportan estabilidad estructural al biofilm maduro tanto en superficies abióticas como en el tracto respiratorio superior de animales infectados (Sloan *et al.*, 2007; Conover, Mishra and Deora, 2011). El exopolisacárido producido por *Bordetella* spp., Bps, es un polímero de N-acetil-D-glucosamina unido por enlaces β -(1,6) y su síntesis depende del locus *bpsABCD* (Parise *et al.*, 2007). La expresión de este locus está bajo el control del factor transcripcional BpsR, el cual reprime la transcripción de dichos genes. Por lo tanto, BpsR inhibe la síntesis de Bps e influye negativamente en la formación de biofilm (Conover *et al.*, 2012). En ensayos de infección en ratones se determinó que el exopolisacárido Bps, tanto de *B. pertussis* como de *B. bronchiseptica*, es necesario para la colonización y persistencia en la cavidad nasal de los animales. Asimismo, cepas que no sintetizan Bps no logran establecer biofilms maduros en el tracto respiratorio como lo hace la cepa *wild type* (Sloan *et al.*, 2007; Conover *et al.*, 2010). Además, se detectó la presencia de ADN extracelular en la matriz de *B. bronchiseptica in vitro* e *in vivo*. Su rol dentro de la matriz fue estudiado mediante el agregado de DNasa I ya que el agregado de dicha enzima al medio de cultivo inhibe la formación de biofilm e inclusive, es capaz de desarmar biofilms ya formados (Conover, Mishra and Deora, 2011).

Regulación de la formación de biofilm en *Bordetella*

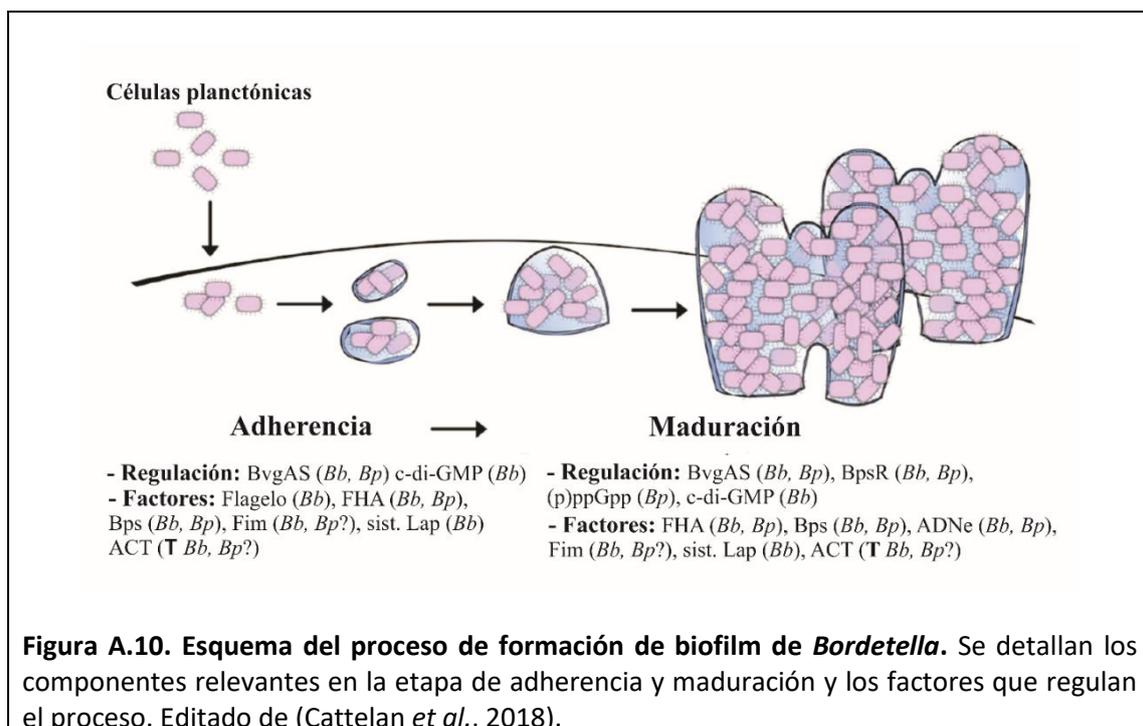
A diferencia de otras bacterias en las que la regulación de la formación de biofilm está muy estudiada, como *E. coli* o *P. aeruginosa*, son pocos los factores descritos hasta el momento que regulan la formación de biofilm de *Bordetella* spp. Entre ellos se incluyen el sistema BvgAS y el factor transcripcional BpsR ya nombrados y dos tipos de segundos mensajeros: el (p)ppGpp y el c-di-GMP. El (p)ppGpp es una molécula involucrada en la transducción de señales en respuesta a estreses, principalmente del tipo nutricional, y su síntesis está a cargo de las proteínas RelA y SpoT (Braeken *et al.*, 2006). Estudios realizados en *B. pertussis* demostraron que la delección de los genes de ambas enzimas disminuye la viabilidad de las bacterias frente a una condición de hambre y al estrés oxidativo. Además, la cepa $\Delta relA\Delta spoT$ presenta una menor capacidad de autoagregación y de formar biofilm que la cepa *wild type* (Sugisaki *et al.*, 2013).

Por otro lado, y como se ha descrito anteriormente, uno de los principales fenotipos regulados por el c-di-GMP en *Bordetella* spp. es la formación de biofilm. Nuestro laboratorio ha sido responsable de la descripción de cómo este segundo mensajero regula la formación de biofilm en *B. bronchiseptica*. Como ocurre en otras bacterias, la presencia de altos niveles de c-

di-GMP estimula la formación de biofilm mientras que la disminución en los niveles de este segundo mensajero, reduce la cantidad de biofilm formado (Sisti *et al.*, 2013)(Manuscrito en preparación).

El sistema Lap de *B. bronchiseptica* está directamente relacionado con el metabolismo de c-di-GMP ya que la proteína LapD es un efector de c-di-GMP. Durante su trabajo de Tesis Doctoral el Dr. Ambrosis describió que la proteína LapD es necesaria para que un aumento en los niveles de c-di-GMP estimule la formación de biofilm en fase intermedia. Además, demostró a través de ensayos de doble híbrido en bacteria (BATCH) que dos DGCs de *B. bronchiseptica* son capaces de interactuar con LapD (Ambrosis, 2018). Más aun, cuando una de dichas DGCs estaba ausente se detectó una menor cantidad de BrtA en la membrana. Todos estos resultados apoyan la hipótesis de que LapD es un efector de c-di-GMP que, cuando las DGCs con las que interactúa están activas, une c-di-GMP y secuestra a LapG en el espacio periplasmático. En esta situación, BrtA permanece anclada a la membrana y contribuye a la formación de biofilm. En lo que respecta a *B. pertussis*, hasta el momento se ha descrito una DGC acoplada a un dominio globina, BpeGreg, que cuando es sobreexpresada en *S. typhimurium* es capaz de sintetizar c-di-GMP, inhibir la movilidad y estimular la formación de biofilm (Wan *et al.*, 2009).

El esquema de la Figura A.10 resume los componentes relevantes en el proceso de formación de biofilm de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* y su regulación.



Al momento de inicio de este trabajo de Tesis el mecanismo de acción por el cual la proteína BvgR regula la expresión de diferentes factores en *Bordetella* no había sido estudiado. Partiendo de la hipótesis de que BvgR, a través de su dominio EAL, participa de la red regulatoria del segundo mensajero c-di-GMP, nos propusimos avanzar sobre la descripción del mecanismo de acción de BvgR.

Este Trabajo de Tesis tiene como **objetivo general** profundizar el conocimiento de la interacción bacteria huésped de forma de establecer las bases que ayuden al desarrollo de estrategias de prevención y eventual erradicación de las enfermedades causadas por las bacterias del género *Bordetella*. Con el fin de avanzar sobre los objetivos generales se propone avanzar sobre la determinación del mecanismo de represión de la expresión de proteínas de *Bordetella* por parte de la proteína BvgR.

Se proponen los siguientes **objetivos particulares**:

- A Análisis bioinformático y bioquímico de la posible actividad fosfodiesterasa de BvgR.
- B Análisis transcriptómico de genes diferencialmente regulados por BvgR.
- C Relación de BvgR con la regulación mediada por c-di-GMP
- D Estudio del rol de BvgR en la infección y en la respuesta inmune en un modelo murino.

Resultados

CAPITULO 1

Análisis bioinformático y bioquímico de la posible actividad fosfodiesterasa de BvgR

Introducción

Con el objetivo de comenzar nuestro estudio sobre la proteína BvgR nos enfocamos en un análisis bioinformático y bioquímico de su posible actividad fosfodiesterasa. En este primer capítulo detallaremos los resultados del análisis bioinformático, el cual constó en la evaluación de la secuencia aminoacídica de la proteína y su comparación con otras fosfodiesterasas ya caracterizadas. Por otro lado, presentaremos los resultados del análisis bioquímico, que implicó el desarrollo de protocolos de purificación y de ensayos de detección de actividad fosfodiesterasa indirectos.

1. Análisis bioinformático

a. Dominio EAL. Localización de aminoácidos relevantes

Para comenzar el estudio de la proteína BvgR se hizo un análisis *in silico* de su secuencia aminoacídica. BvgR consta de 291 aminoácidos y su peso molecular calculado es de 32 kDa (32240 Da). Un análisis de detección de dominios con el software *online* ScanProsite reveló que cuenta con un único dominio, del tipo EAL, desde el residuo 31 al 285, tal como se muestra en la Figura 1.1. (de Castro *et al.*, 2006).



Figura 1.1. Predicción de dominios sobre la secuencia aminoacídica de BvgR obtenida por el software *online* ScanProsite.

Como se ha mencionado, las proteínas con dominio EAL están asociadas a actividades fosfodiesterasas específicas de c-di-GMP. Además, se observó que BvgR está altamente conservada en las clásicas *Bordetellas* (*B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*) pero no en el resto de las bacterias del género. Una búsqueda en BLAST utilizando como *query* a BvgR y excluyendo a las clásicas *Bordetellas*, no arroja ningún resultado. Dentro de la clásicas *Bordetellas*, BvgR mantiene su longitud y los pocos aminoácidos que difieren entre las especies no son cambios significativos: una treonina por una metionina en *B. parapertussis* Bpp5 en la posición 85, una lisina por una asparagina en la posición 116 en *B. bronchiseptica* MO146, una

valina por una alanina en *B. bronchiseptica* RB50 en la posición 223, una arginina por una glutamina en *B. paraptussis* Bpp5 en la posición 237, y por último, casi todas las secuencias de *B. bronchiseptica* y *B. paraptussis* presentan una treonina en la posición 244 mientras que las de *B. pertussis* presentan una alanina (Figura 1.2).

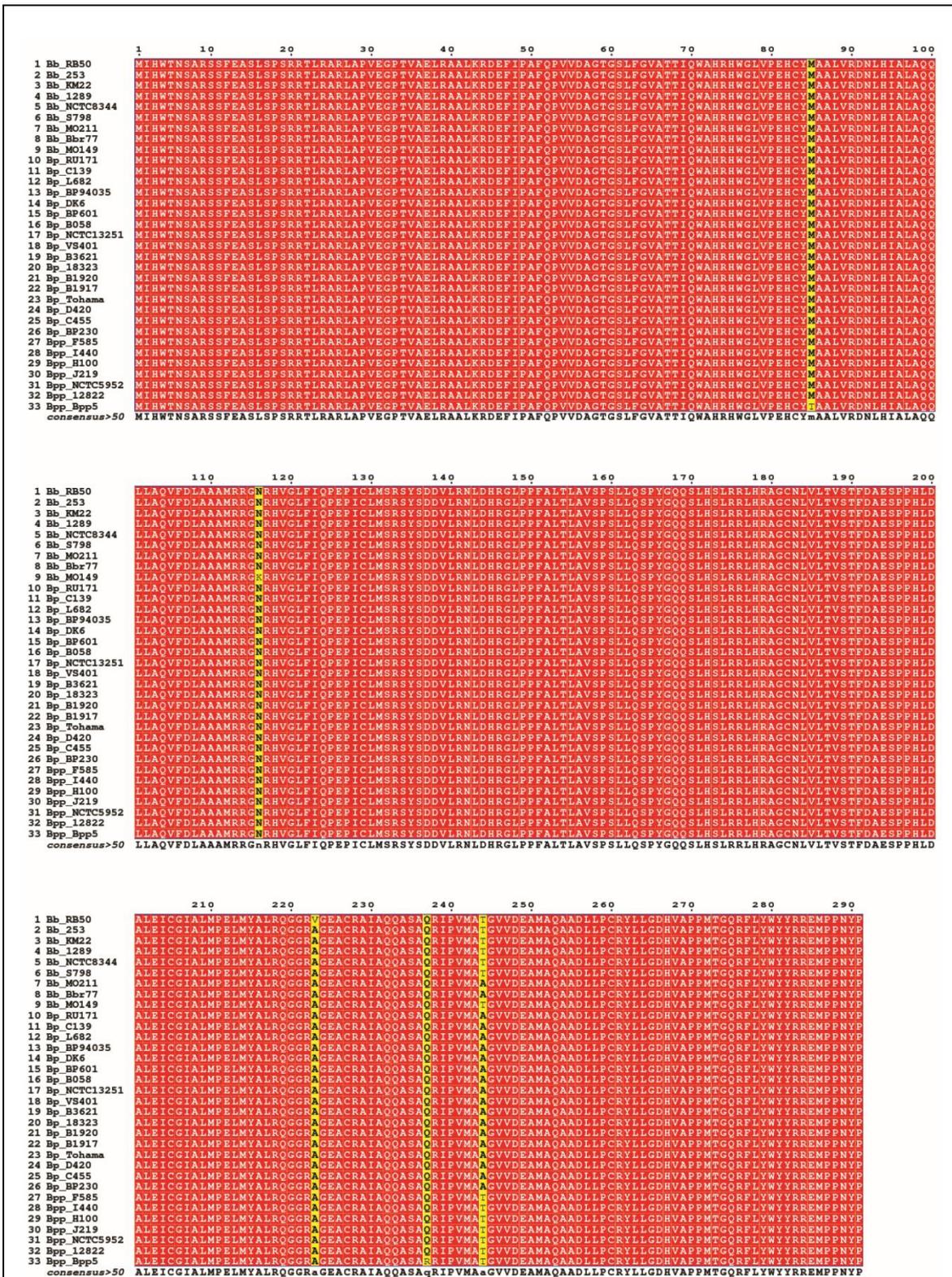


Figura 1.2. Conservación de BvgR en *Bordetella*. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de BvgR entre distintas cepas de *B. bronchiseptica*, *B. pertussis* y *B. parapertussis*. En rojo se resaltan los aminoácidos conservados en todas las secuencias alineadas, mientras que en amarillo se resaltan aquellas posiciones que presentan diferentes aminoácidos.

Los dominios EAL pueden clasificarse en tres categorías de acuerdo a la conservación del sitio activo y del *loop* de dimerización (*loop* 6) (Rao *et al.*, 2009). En la primera categoría se encuentran las fosfodiesterasas de c-di-GMP genuinas (i); en la segunda aquellas que cuentan con un *loop* 6 degenerado y que podrían o no tener actividad fosfodiesterasa (ii); y en la tercera categoría, aquellas que carecen de los residuos clave para la actividad catalítica y que por ello no tienen actividad fosfodiesterasa (iii). Asimismo, la tercera categoría puede dividirse en función de si el dominio EAL retuvo su capacidad de unir c-di-GMP (a) y entonces puede actuar como un efector de c-di-GMP, o si la perdió (b).

Como se explicó en la introducción, la mayoría de las proteínas con dominio EAL tienen además algún dominio de señalización en el extremo N-terminal encargado de regular la constitución de la forma catalítica de la proteína. Sin embargo, existen proteínas que únicamente contienen un dominio EAL, denominados dominios *stand-alone* EAL (Mouali *et al.*, 2017). De acuerdo a la base de datos Pfam (PF00563) este grupo de proteínas constituye el 14% de las proteínas que contienen un dominio EAL (6616 secuencias solo EAL/45315 secuencias que contienen EAL), aunque es probable que muchas de estas proteínas incluyan un dominio sin caracterizar en su secuencia y, por ende, el número de proteínas únicamente EAL sea menor.

Dentro de la categoría de proteínas *stand-alone* EAL, algunas de éstas son efectivamente fosfodiesterasas de c-di-GMP activas. Éste es el caso de PdeH (YhjH) de *E. coli* y STM3611 (YhjH) de *S. typhimurium*, que intervienen en la regulación de la movilidad celular modificando los niveles de c-di-GMP de dichas bacterias (Simm *et al.*, 2004; Pesavento *et al.*, 2008b). Por el contrario, se han descrito proteínas únicamente EAL que no presentan actividad fosfodiesterasa ni unen c-di-GMP, pero aun así son capaces de regular ciertos fenotipos como la movilidad, la adhesión celular y la supervivencia de bacterias en macrófagos. Éste es el caso de YdiV de *E. coli* y STM1344 (YdiV) en *S. typhimurium* (Wada *et al.*, 2011; Wada, Hatamoto and Kutsukake, 2012). El mecanismo de regulación puesto en juego en estos casos es mediante la interacción de YdiV con el regulador maestro de la movilidad, FlhD, previniendo su interacción con la ADN polimerasa y estimulando su proteólisis por la proteasa ClpX (Takaya *et al.*, 2012).

Estudios bioquímicos demostraron que las proteínas con dominio EAL requieren Mg^{+2} o Mn^{+2} para poder hidrolizar c-di-GMP. También se observó que los iones Zn^{+2} y Ca^{+2} inhiben fuertemente la actividad enzimática, probablemente al desalojar el ion Mg^{+2} (Schmidt, Ryjenkov and Gomelsky, 2005).

En algunos dominios EAL purificados, como los correspondientes a las proteínas RocR y PA2576 de *P. aeruginosa*, la conservación del *loop* 6 es esencial para la unión del ion metálico, la unión del c-di-GMP y para la dimerización, mientras en otros casos no lo es (Rao *et al.*, 2009). La purificación y cristalización de proteínas con dominio EAL ha demostrado que no hay una regla general respecto a la oligomerización de las proteínas, dado que se han descrito proteínas cristalizadas en forma de dímero, tetrámero e inclusive en forma monomérica. De todas formas, la cristalización de dichas proteínas ha brindado información acerca del mecanismo de acción de las fosfodiesterasas.

El alineamiento de la secuencia aminoacídica del dominio EAL de aquellas proteínas con actividad fosfodiesterasa reveló la presencia de 13 aminoácidos conservados, 10 de ellos cargados o polares. Las estructuras cristalizadas de proteínas con dominio EAL así como los ensayos de mutagénesis sobre éstas, permitieron determinar la importancia de cada residuo conservado, tal como se describen en la Figura 1.3 (Rao *et al.*, 2008; Tchigvintsev *et al.*, 2010). De ellos, por lo menos 7 residuos están involucrados en la unión del ion metálico, Mg^{+2} o Mn^{+2} : los residuos #2, 4, 5 y 7, correspondientes a la proteína BlrP1 de *K. pneumoniae*, (E36, N95, E127 y D157, verde claro) unen de manera directa al catión mientras que los residuos #9, 12 y 13 (K178, E217 y Q234, verde oscuro) intervienen indirectamente. Por otra parte, los residuos #1, 3, 8 y 10 (Q22, R40, D158 y D180, celeste) están involucrados en la unión al sustrato mientras que el residuo de glutamato ubicado en la posición #6 (E130, naranja), estabiliza al *loop* 6. Por último, el residuo de glutamato en la posición #11 (E214, magenta) funciona como base general, coordinando a la molécula de agua catalítica (Figura 1.3). La mutación de cualquiera de los cuatro residuos que coordinan el ion metálico resulta en una drástica disminución de la actividad, indicando que todos son indispensables para la unión del ion (Tchigvintsev *et al.*, 2010). Dicha disminución en la actividad catalítica puede restablecerse si se aumenta la concentración de Mg^{+2} (o Mn^{+2}) en el ensayo, lo cual sugiere que las mutaciones disminuyen la afinidad de unión al ion metálico.

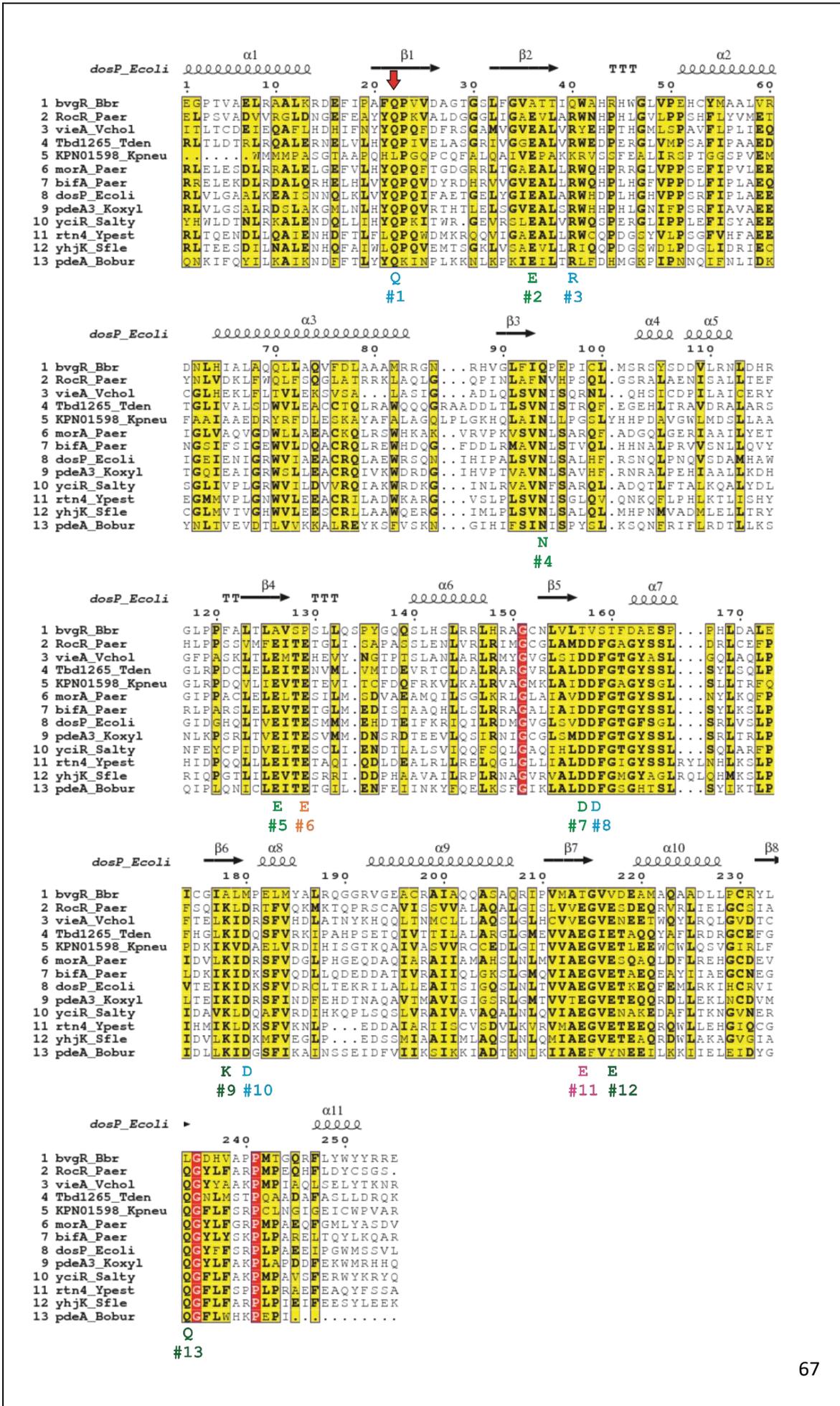


Figura 1.3. Alineamiento del dominio EAL de BvgR con el dominio EAL de proteínas con actividad fosfodiesterasa. En amarillo se resaltan los residuos conservados y en rojo, aquellos presentes en todas las proteínas estudiadas. Se detalla la estructura secundaria del dominio EAL de DosP de *E. coli* por encima de los alineamientos. Abajo de los alineamientos se indican los residuos clave descritos para la unión de Mn^{+2} o Mg^{+2} de manera directa (verde claro) e indirecta (verde oscuro), para la unión al sustrato (celeste), para estabilizar el *loop* 6 (naranja) y el residuo que coordina la molécula de agua catalítica (magenta). La secuencia del *loop* 6 -DFG(A/T)GYSS- se encuentra entre la hoja β -plegada 5 y la α -hélice 7. La flecha roja indica el único residuo clave conservado en la secuencia de BvgR de *B. bronchiseptica*.

Cuando realizamos el alineamiento de la secuencia de BvgR con el software multAlin (F. Corpet, 1988) junto a las de proteínas con dominio EAL activo, sólo uno de los residuos clave para la actividad catalítica se encontró conservado en BvgR, este es el #1 (Q22, marcado con una flecha roja), vinculado a la unión del sustrato (Figura 1.3). El resto de los residuos clave no se encontró conservado en BvgR. Esto incluye al residuo #2 correspondiente al glutamato del motivo EAL que da nombre al dominio. Numerosos estudios de mutagénesis en proteínas con dominio EAL demostraron que cambiar dicho glutamato por una alanina es suficiente para que se pierda la actividad fosfodiesterasa *in vitro* de la proteína (Christen *et al.*, 2005; Tamayo, Tischler and Camilli, 2005; Rao *et al.*, 2008). Asimismo, BvgR presenta una treonina en reemplazo del glutamato que actúa de base catalítica y tiene el *loop* 6 altamente degenerado. La ausencia del glutamato del residuo #2 en BvgR sugiere que la proteína BvgR no presentaría actividad fosfodiesterasa (Figura 1.3).

Como ya se ha mencionado, algunas proteínas sin actividad fosfodiesterasa pueden ejercer su función regulatoria mediante su interacción con FlhD, como es el caso de YdiV y STM1697 de *S. typhimurium*. YdiV regula la movilidad en *S. typhimurium* y en *E. coli* interactuando con el complejo FlhD₄C₂, previniendo su unión al ADN y llevándolo a un proceso de degradación mediado por ClpXP (Takaya *et al.*, 2012). En *S. typhimurium* STM1697 regula la movilidad al interactuar con FlhD₄C₂ e impedir el reclutamiento de la ARN polimerasa (Li *et al.*, 2017).

Dado que según el análisis anterior BvgR no tendría actividad fosfodiesterasa y que se ha descrito que regula la movilidad de *B. bronchiseptica*, se realizó un alineamiento para determinar si podría interactuar con FlhD. En la Figura 1.4 se muestra la secuencia de BvgR alineada a otras diez secuencias pertenecientes a la clase III de PDEs, es decir, aquellas que carecen de actividad fosfodiesterasa de acuerdo a la falta de aminoácidos conservados en el motivo EAL. Las primeras cinco secuencias después de BvgR corresponden a la subclase IIIa, entre las cuales se incluyen FimX de *P. aeruginosa* y LapD de *P. fluorescences*, mientras que las siguientes cinco pertenecen a la subclase IIIb, entre las que encontramos a YdiV de *S.*

typhimurium y *E. coli*, STM11697 de *S. typhimurium*, YE1342 de *Y. enterocolitica* y ToxR de *P. aeruginosa*. En la figura se muestran marcados en rojo los residuos clave para la interacción YdiV-FlhD, en verde aquellos para la interacción STM1697-FlhD y en naranja aquellos residuos que median la interacción entre alguna de estas proteínas con FlhD. YdiV y STM1697 interaccionan con FlhD con la misma hélice alfa pero los sets de aminoácidos requeridos para ello son distintos: para la interacción YdiV-FlhD se necesitan 4 aminoácidos clave (F155, F168, F181 y A184, en rojo) mientras que para STM1697, sólo 2 (F160 y L173, en verde). En el alineamiento se puede observar que BvgR comparte únicamente uno de los aminoácidos clave para la interacción YdiV-FlhD, una alanina en la posición 199 que corresponde a A184 de YdiV. Además, comparte dos aminoácidos que se encuentran en la misma alfa hélice involucrada en la interacción (en celeste). El resto de los aminoácidos importantes para la interacción de YdiV y STM1697 con FlhD no se encuentran en BvgR y las sustituciones no resultan funcionalmente equivalentes.

Por otro lado, la comparación entre las proteínas FlhD de *B. bronchiseptica* y de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Infantis* no presentan similitudes en los aminoácidos que Li y colaboradores han descrito como intervinientes en la interacción entre una proteína EAL (STM1697) y FlhD (Li *et al.*, 2017). De acuerdo a todas estas observaciones concluimos que BvgR no podría interactuar con FlhD en la manera en que YdiV o STM1697 lo hacen. No obstante, no se puede descartar que BvgR sea capaz de interactuar con otras proteínas mediante esa misma región (Figura 1.4).

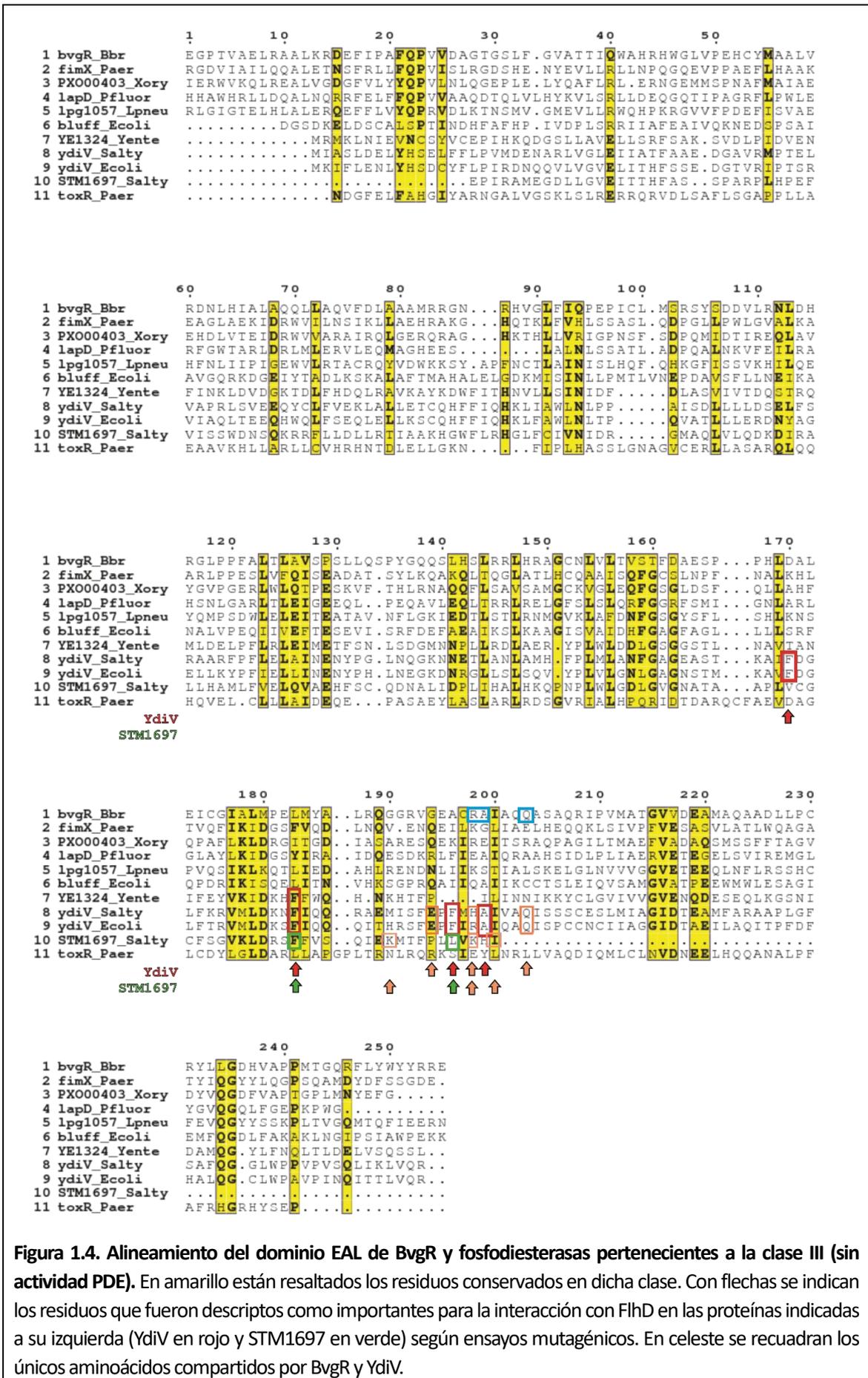
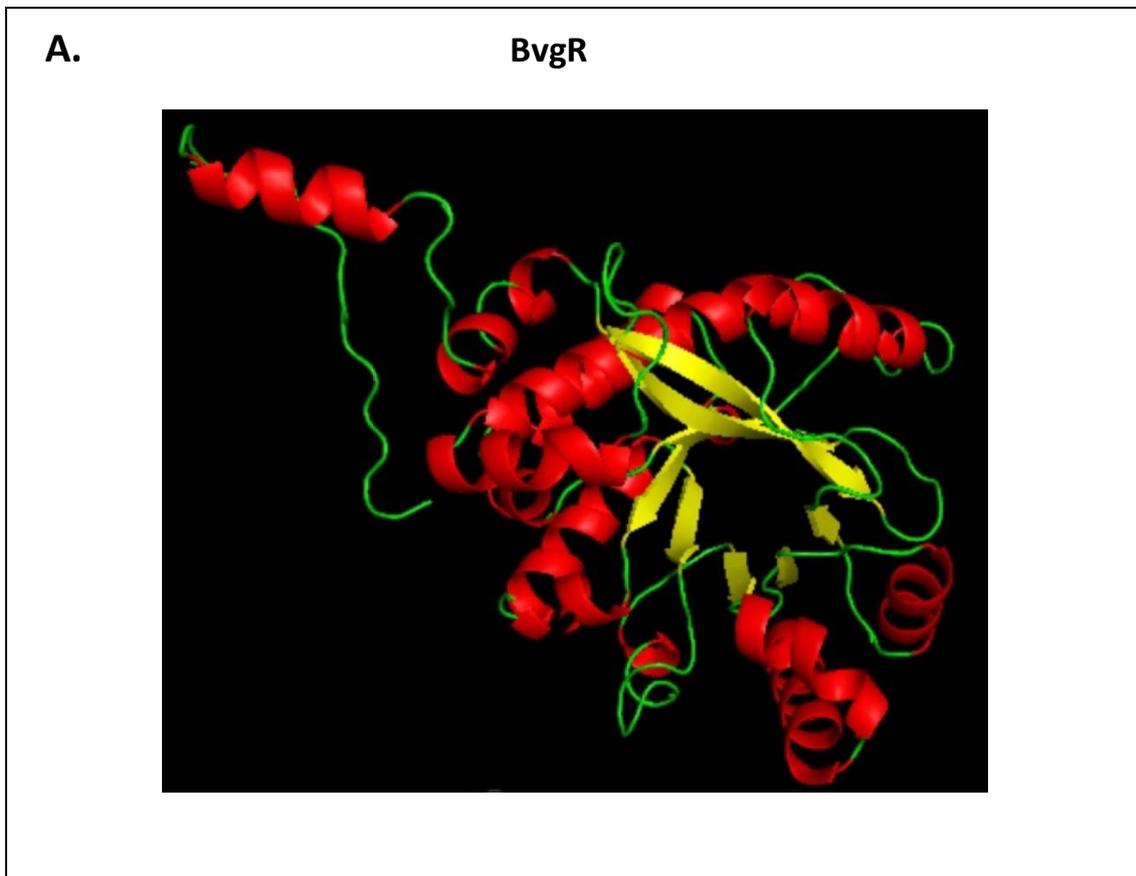


Figura 1.4. Alineamiento del dominio EAL de BvgR y fosfodiesterasas pertenecientes a la clase III (sin actividad PDE). En amarillo están resaltados los residuos conservados en dicha clase. Con flechas se indican los residuos que fueron descritos como importantes para la interacción con FlhD en las proteínas indicadas a su izquierda (YdiV en rojo y STM1697 en verde) según ensayos mutagénicos. En celeste se recuadran los únicos aminoácidos compartidos por BvgR y YdiV.

Respecto a la estructura de BvgR, el modelado estructural con Phyre 2.0 revela que la proteína BvgR tendría un plegamiento del tipo *TIM barrel*, compuesto por un barril β de 8 hebras, una de ellas ($\beta 1$) con orientación antiparalela al resto (Figura 1.5, panel A). Este tipo de plegamiento tipo *TIM barrel* con la hoja $\beta 1$ en sentido antiparalelo ya ha sido descrito en otras proteínas con dominio EAL, como TBD1265 de *Thiobacillus denitrificans*, Ykul de *Bacillus subtilis* y FimX de *P. aeruginosa* (Tchigvintsev *et al.*, 2010). En el panel B de la Figura 1.5 se puede observar el mismo plegamiento tipo *TIM barrel* en la estructura cristalizada del dominio EAL de la proteína FimX de *P. aeruginosa* (PDB 3HV9) (Navarro *et al.*, 2009). La conformación estructural *TIM barrel* es muy estable y versátil, por lo que está conservada en un gran número de enzimas, incluyendo isomerasas, oxidorreductasas, liasas, transferasas y una gran mayoría de hidrolasas (Wierenga, 2001).



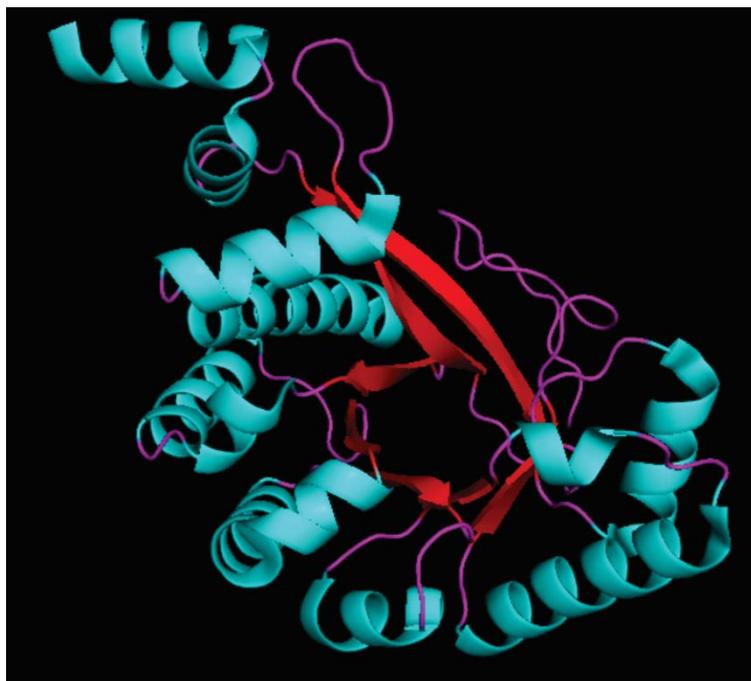
B. Dominio EAL- FimX

Figura 1.5. Modelado estructural de BvgR y su comparación con la estructura de un dominio EAL cristalizado. **A.** Se obtuvo el modelado estructural de la proteína con el software Phyre2. La disposición de las hojas β plegadas en amarillo representan un plegamiento tipo *TIM barrel*. Las α -hélices se muestran en rojo y los *loops* en verde. **B.** Estructura del dominio EAL cristalizado (PDB 3HV9) de la proteína FimX de *P. aeruginosa*. Las hojas β plegadas se representan en rojo, las α -hélices en celeste y los *loops* en fucsia.

2. Purificación de BvgR

a. Ensayos de expresión y purificación

Para corroborar la actividad catalítica de una posible fosfodiesterasa de c-di-GMP, la técnica *gold standard* de degradación de c-di-GMP implica la incubación de la proteína a evaluar con c-di-GMP purificado, seguida de HPLC-MS. De esta manera, los compuestos en solución se separan por HPLC y la concentración de c-di-GMP restante se cuantifica por espectrometría de masa. Una primera aproximación es sobreexpresar la posible fosfodiesterasa en la bacteria correspondiente o en *E. coli* y utilizar el extracto celular para llevar adelante la determinación. Este tipo de ensayo ocasionalmente se considera prueba suficiente, pero resulta más riguroso purificar la proteína a evaluar y realizar la determinación *in vitro* con ella.

A la hora de establecer una estrategia para determinar si BvgR tiene actividad fosfodiesterasa se tuvieron en cuenta dos factores: primero, que BvgR no debería ser

catalíticamente activa según el análisis bioinformático y segundo, que ha sido reportada como una proteína reguladora (represora). Por lo tanto, consideramos que realizar un ensayo de degradación de c-di-GMP con un extracto celular complejo es un enfoque que puede prestarse a confusión, ya que si BvgR regula la actividad de proteínas relacionadas al metabolismo del c-di-GMP, se podrían malinterpretar los resultados y otorgar a BvgR una función que ella misma no cumple. Es por ello que decidimos avanzar en la purificación de BvgR, con el fin de realizar los ensayos *in vitro* de la manera más limpia posible.

La secuencia aminoacídica de BvgR no incluye ningún dominio transmembrana ni ningún péptido señal de acuerdo al análisis bioinformático, lo cual sugiere que se localiza en el citoplasma de *B. bronchiseptica*. Inicialmente elegimos como vector de expresión al plásmido pET200, que añade una etiqueta de seis histidinas (6His) en el extremo C-terminal de la proteína para su purificación, y como cepa de expresión a *E. coli* BL21. Se ensayaron distintas condiciones de expresión en las que se modificaron las concentraciones del inductor utilizado (IPTG), las temperaturas y los tiempos post-inducción. No obstante, no fue posible obtener una cantidad importante de proteína expresada. Asimismo, se probaron otros vectores (pBBR1MCS-5 bajo un promotor fuerte y pMQ72), con el mismo resultado. En términos generales, las cepas conteniendo los vectores elegidos fueron cultivadas a 37°, 28° y 15°, con toma de muestra cada dos horas hasta un tiempo final post inducción de 6 horas. Esta última temperatura se eligió porque se ha visto que la sobreexpresión de proteínas a bajas temperaturas en *E. coli* mejora la solubilidad de proteínas difíciles de expresar en otras condiciones debido a su tendencia a formar agregados. Con respecto a las concentraciones de los inductores utilizados, el pET200 BvgR-6His fue evaluado con el agregado de 0.5 mM y 1 mM de IPTG mientras que el PMQ72 BvgR-6His con el agregado de 0,2 % p/v de sacarosa.

El vector pBBR1MCS-5*pnptII* es un plásmido de bajo número de copias que tiene un sitio de replicación compatible con las bacterias del género *Bordetella* y es habitualmente utilizado para sobreexpresar proteínas (bajo el control del promotor fuerte de *nptII*) y complementar cepas mutantes en estas bacterias. De hecho, el plásmido pBBR1MCS-5*pnptII* BvgR-6His es capaz de complementar al mutante BvgR, lo cual indica que la proteína se expresa. No obstante, la expresión de BvgR-6his desde este plásmido en *E. coli* no generó cantidades considerables de proteína para proseguir con un proceso de purificación. Teniendo en cuenta que algunas proteínas no pueden expresarse correctamente en *E. coli* debido a que requieren la presencia de otra proteína para su estabilización, se intentó detectar a BvgR-6His en una cepa *B. bronchiseptica* que llevaba al plásmido pBBR1MCS-5*pnptII* BvgR-6His, pero no se observó

ninguna banda evidente en un gel de poliacrilamida correspondiente a BvgR-6His ni se detectó por *Western blot* con un anticuerpo anti-histidina.

Frente a estas dificultades iniciamos una colaboración con el Dr. Rosano y con el Dr. Ceccarelli del grupo de Estructura, Plegamiento y Función de Proteínas del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR), especialistas en expresión y purificación de proteínas. Ellos nos indicaron que la proteína BvgR era insoluble y diseñaron una estrategia de expresión y purificación de BvgR, que se explicará en el inciso c.

b. Insolubilidad de BvgR

Como se mencionó anteriormente, BvgR podría tener características insolubles por lo que decidimos evaluarlo mediante un análisis bioinformático. El principal determinante de la solubilidad de una proteína es su secuencia aminoacídica, según el contenido de residuos cargados, el nivel de hidrofobicidad, la cantidad de los distintos tipos de residuos y la longitud de la secuencia. Es por ello que se han podido desarrollar predictores de solubilidad de proteínas basados en su secuencia aminoacídica. Algunos programas, como CamSol (Sormanni, Aprile and Vendruscolo, 2015), predicen perfiles de solubilidad otorgando un puntaje a cada residuo, el cual indica su impacto en la solubilidad total de la proteína. En el método CamSol las regiones con puntajes mayores a 1 son altamente solubles mientras que aquellas menores a -1, son poco solubles. En la Figura 1.6 se puede observar que BvgR tiene diez regiones claramente poco solubles (indicadas en rojo) y ocho regiones altamente solubles (indicadas en azul).

Otros programas, como el software *online* Protein-sol, predicen la solubilidad de la proteína como un todo, basándose en su longitud, carga absoluta, tendencia de plegamiento y entropía de la secuencia, entre otros factores (Hebditch *et al.*, 2017). El índice de solubilidad predicha por Protein-Sol para BvgR fue de 0,267. De acuerdo a este programa, índices mayores a 0,45 indican que una proteína tiene una solubilidad mayor a la del promedio de las proteínas solubles de *E. coli*, el cual se obtuvo a partir de datos experimentales, mientras que índices menores a 0,45 corresponden a proteínas con una solubilidad menor a la del promedio. Este resultado predice entonces que BvgR es menos soluble que el promedio de las proteínas de *E. coli*.

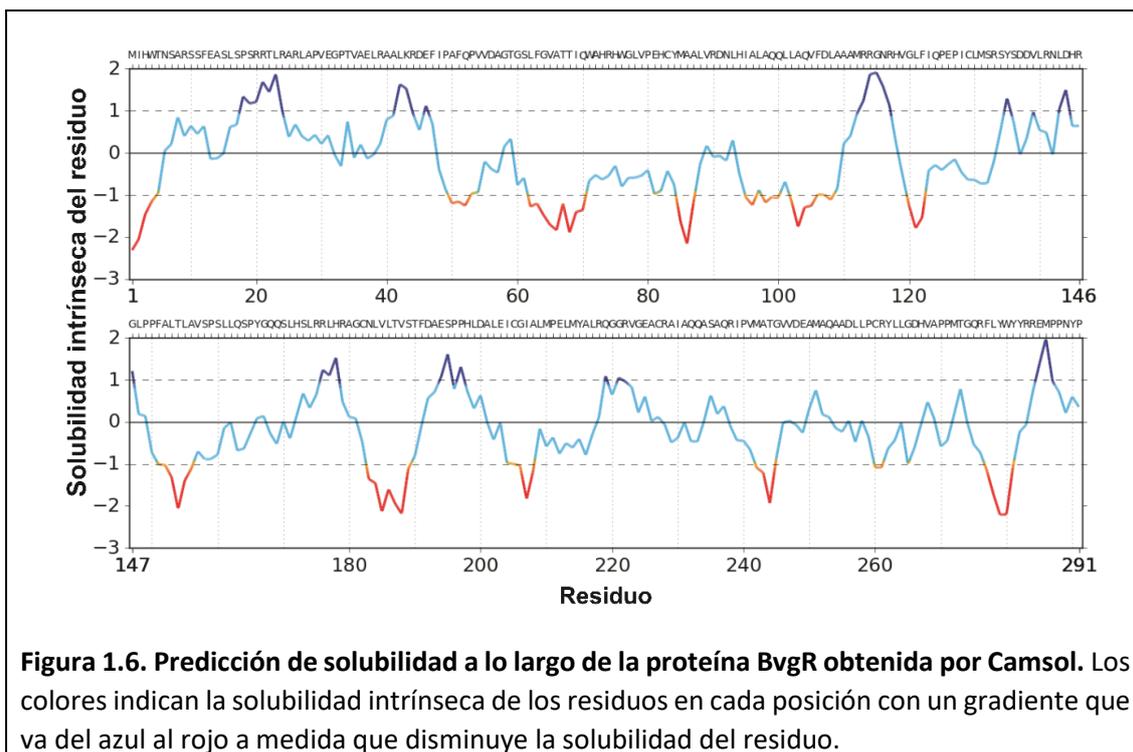


Figura 1.6. Predicción de solubilidad a lo largo de la proteína BvgR obtenida por Camsol. Los colores indican la solubilidad intrínseca de los residuos en cada posición con un gradiente que va del azul al rojo a medida que disminuye la solubilidad del residuo.

Al estudiar la superficie de BvgR vemos que numerosos residuos hidrofóbicos quedan expuestos hacia el exterior de la proteína, lo cual contribuye a su insolubilidad. Se puede observar claramente esta característica en la Figura 1.7, en la que se muestra la estructura modelada de BvgR con los residuos hidrofóbicos marcados en rojo (alanina, glicina, leucina, isoleucina, fenilalanina, metionina, prolina y valina).

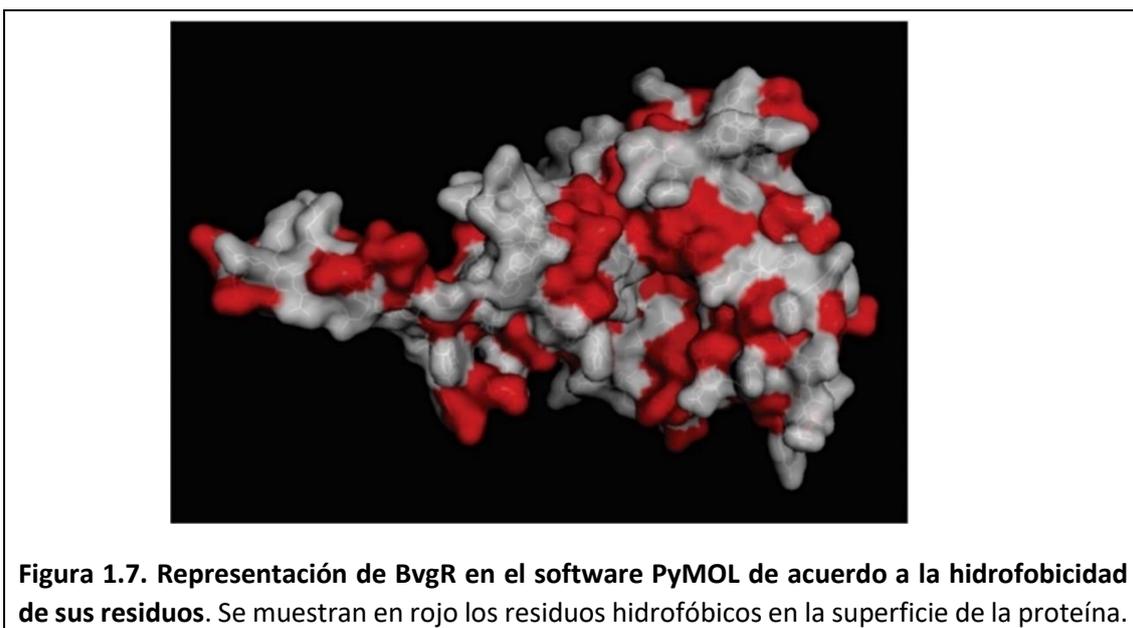


Figura 1.7. Representación de BvgR en el software PyMOL de acuerdo a la hidrofobicidad de sus residuos. Se muestran en rojo los residuos hidrofóbicos en la superficie de la proteína.

La dificultad de expresar BvgR y otras proteínas constituidas únicamente por un dominio EAL ya ha sido publicado. Por ejemplo, Cróinín y colaboradores publicaron en 2004 que intentaron purificar BvgR aplicando múltiples estrategias, pero ninguna resultó exitosa ya que en todos los casos BvgR formó cuerpos de inclusión en *E. coli* y no fue posible solubilizarla inclusive tras varios pasos de diálisis (Cróinín, Grippe and Merkel, 2005).

Este fenómeno refuerza la idea de que BvgR interactúa con otras proteínas en el citoplasma de *Bordetella* spp., las cuales podrían volverla más soluble o bien, con proteínas de la membrana interna de la bacteria.

c. Fusión a MBP

Anteriormente se mencionó que para poder avanzar en la purificación de BvgR nos contactamos con el Dr. Rosano y el Dr. Ceccarelli del IBR. Ellos clonaron a *bvgR* en distintos vectores de expresión pET-32a de manera que BvgR quede fusionada a dominios solubilizadores como Trx, DsbC, MBP y CelDnc (Correa *et al.*, 2014) marcados con etiquetas de seis histidinas. Expresaron estos plásmidos en dos cepas de expresión de *E. coli*, BL21(DE3) pLysS y BL21(DE3) CodonPlus (Rosano and Ceccarelli, 2009). En ningún caso se pudo observar expresión de las proteínas en la cepa BL21(DE3) pLysS, por lo que se descartó dicha cepa y se prosiguió usando a la cepa BL21 CodonPlus. Este cambio resultó adecuado ya que la secuencia de *bvgR* mostró una alta cantidad de codones raramente expresados en la cepa BL21 estándar y esta cepa corrige dicho sesgo al sobreexpresar ciertos tRNAs que están en baja cantidad en *E. coli* (Rosano and Ceccarelli, 2009). En esta cepa se pudo obtener producto soluble en los ensayos de expresión con las construcciones con DsbC y MBP. Se continuó con el proceso de purificación con la construcción BvgR-MBP (*maltose-binding protein*) dado que fue con la que se obtuvo una mayor cantidad de producto soluble.

Los ensayos de purificación se llevaron adelante en una columna con Ni-NTA-agarosa como resina, por la cual se hizo pasar un extracto celular de la cepa elegida, se lavó y se eluyó con *buffer* de lisis con imidazol 200 mM. El eluido, con alta cantidad de proteína de fusión, pero con bandas de degradación, se desaló utilizando una columna PD-10 y se sometió a una digestión con proteasa His6-TEV cuyo sitio de corte se encuentra entre la proteína BvgR y el dominio MBP. Tras el corte con TEV, la muestra se corrió en un gel de poliacrilamida y no se observó ninguna banda en el peso molecular esperado para BvgR, aunque se observó la presencia de MBP y de una proteína que podría ser la chaperona DnaK, según su peso molecular (69 kDa). La presencia

de DnaK durante la purificación de proteínas de fusión es habitual dado que chaperonas como DnaK se unen a la región peptídica que une el dominio solubilizador con la proteína de interés y además porque su expresión se ve aumentada debido a la presencia de proteínas mal plegadas (Morales, Parcerisa and Ceccarelli, 2019).

Debido a que no nos fue posible obtener a BvgR sin la fusión a MBP, decidimos evaluar la purificación desde un entorno en donde BvgR se encuentra habitualmente. La construcción *bvgR*-MBP se subclonó en el plásmido pBBR1MCS-5 bajo el promotor fuerte *pnptII* y se transfirió mediante conjugación tanto a la cepa *B. bronchiseptica wild type* como a la mutante $\Delta bvgR$. Se realizaron ensayos de purificación de BvgR-MBP aprovechando la etiqueta de seis histidinas de la construcción, a partir del mutante $\Delta bvgR$. Para ello, se cultivaron en medio líquido durante 16 horas a 37°C tanto el mutante $\Delta bvgR$ llevando la construcción con *bvgR*-MBP y el plásmido vacío, como control. A partir de los cultivos, se realizó una purificación con columnas de níquel. En la Figura 1.8 (panel A) se puede observar la presencia de una banda con un peso molecular cercano a los 70 kDa en la muestra correspondiente al extracto crudo de la cepa llevando la construcción con BvgR-MBP, pero no en la que lleva el plásmido vacío. Este peso molecular corresponde al de la proteína BvgR fusionada a MBP, calculado en 73 kDa. No obstante, tras la purificación con columna de níquel se observó una banda en la muestra obtenida a partir de la cepa *Bb $\Delta bvgR$* que expresa BvgR-MBP, y no en la obtenida a partir de la cepa llevando el plásmido vacío, con un peso molecular menor al esperado (cerca de los 63 kDa) (Figura 1.8, panel B). Debido a la falta de disponibilidad en nuestro laboratorio de anticuerpos específicos para BvgR o MBP, no pudimos confirmar si dicha banda correspondía a BvgR-MBP o a la chaperona DnaK que, como se mencionó anteriormente, puede ser arrastrada durante el proceso de purificación.

Como se mencionó en la introducción de esta Tesis, una cepa de *B. bronchiseptica* mutante en *bvgR* presenta movilidad en agar blando en fase virulenta mientras que la cepa *wild type* no. La construcción *bvgR*-MBP revirtió el fenotipo de movilidad que presenta la mutante $\Delta bvgR$ durante la fase virulenta. Esto concuerda con los resultados presentados por la Dr. Fernández en su Tesis doctoral cuando complementó el mutante insercional *BbbvgR*⁻ con *bvgR* desde un plásmido y no observó movilidad en fase virulenta (Fernandez, 2004). Por otro lado, se evaluó la movilidad de estas cepas en presencia de MgSO₄. En condiciones de avirulencia tanto la mutante $\Delta bvgR$ con el plásmido vacío como la mutante complementada con pBBR1MCS-5 *pnptII bvgR*-6His se movieron igual que la cepa salvaje. Sin embargo, al sobreexpresar la construcción con *bvgR*-MBP en estas condiciones la movilidad se vio parcialmente reducida (Figuras 1.9 y 1.10, abajo). Esto indica que la proteína BvgR fusionada a MBP mantiene su funcionalidad.

Además, este resultado sugiere que la fusión a MBP podría hacer a la proteína BvgR aún más estable en *B. bronchiseptica* y por ello, presentar un fenotipo represor de la movilidad más fuerte que el observado con la sobreexpresión de BvgR sin fusionar.

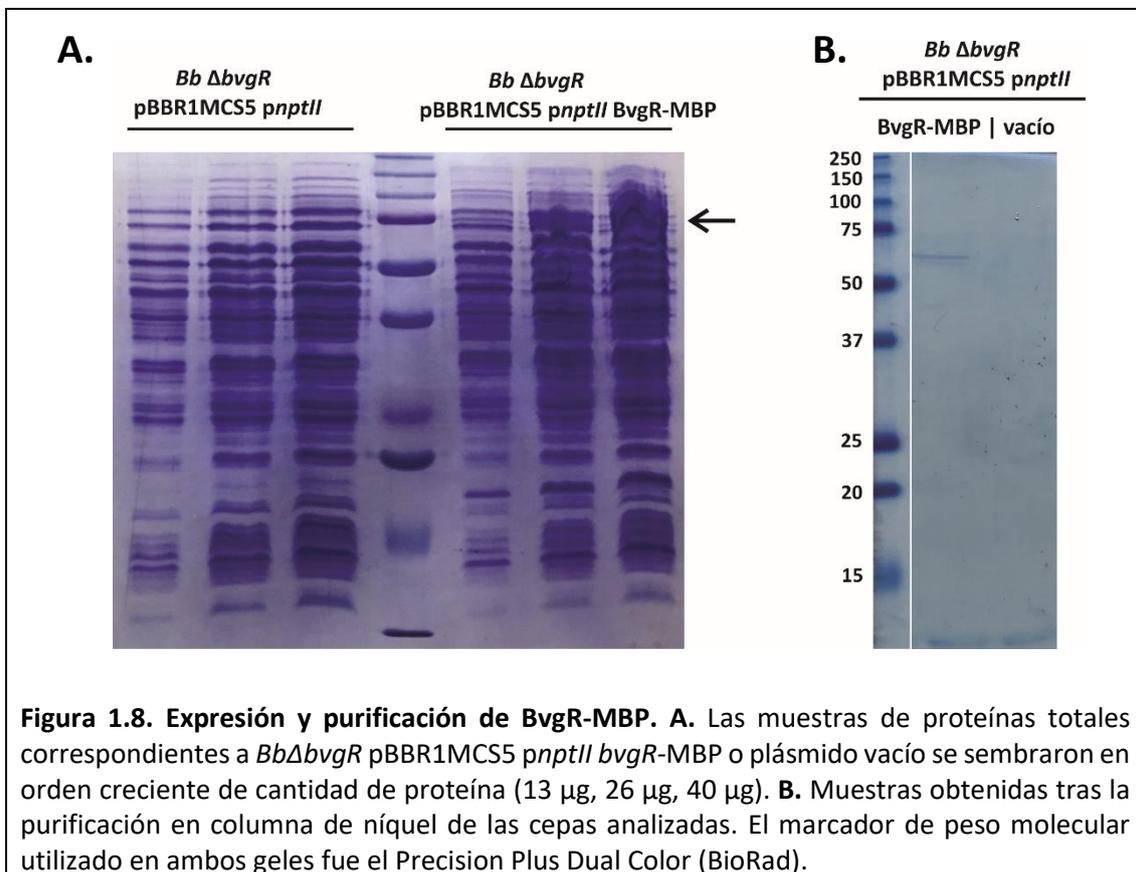


Figura 1.8. Expresión y purificación de BvgR-MBP. **A.** Las muestras de proteínas totales correspondientes a *BbΔbvgR* pBBR1MCS5 *pnptII* *bvgR*-MBP o plásmido vacío se sembraron en orden creciente de cantidad de proteína (13 μg, 26 μg, 40 μg). **B.** Muestras obtenidas tras la purificación en columna de níquel de las cepas analizadas. El marcador de peso molecular utilizado en ambos gels fue el Precision Plus Dual Color (BioRad).

3. Actividad fosfodiesterasa

a. BvgR y el fenotipo de movilidad asociado a fosfodiesterasas

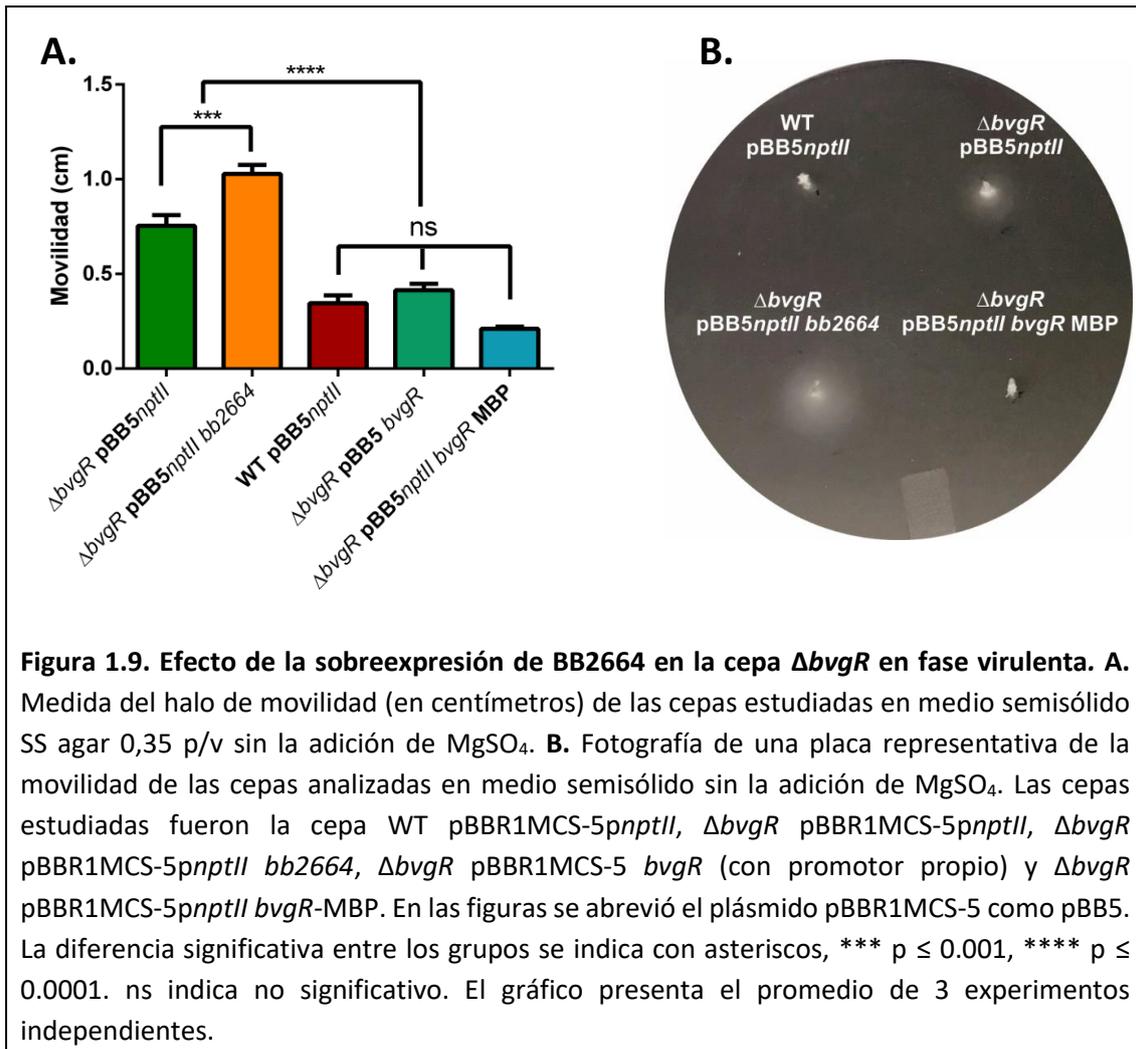
Dentro del esquema en el que c-di-GMP regula la transición del estado de vida planctónico al de biofilm, altos niveles de c-di-GMP inhiben la movilidad mientras una disminución en los niveles de c-di-GMP se asocia con un fenotipo móvil.

En este contexto, la sobreexpresión de una fosfodiesterasa puede aumentar la capacidad de nadar de una bacteria mientras que la sobreexpresión de una diguanilato ciclasa, la puede disminuir. Un ejemplo de ello es lo que ocurre con la proteína BifA de *P. aeruginosa*, con actividad fosfodiesterasa, cuya sobreexpresión provoca un aumento en la movilidad bacteriana y una disminución en la formación de biofilm (Kuchma *et al.*, 2007). Asimismo, la mutación de una fosfodiesterasa involucrada en la regulación de la movilidad puede causar una disminución

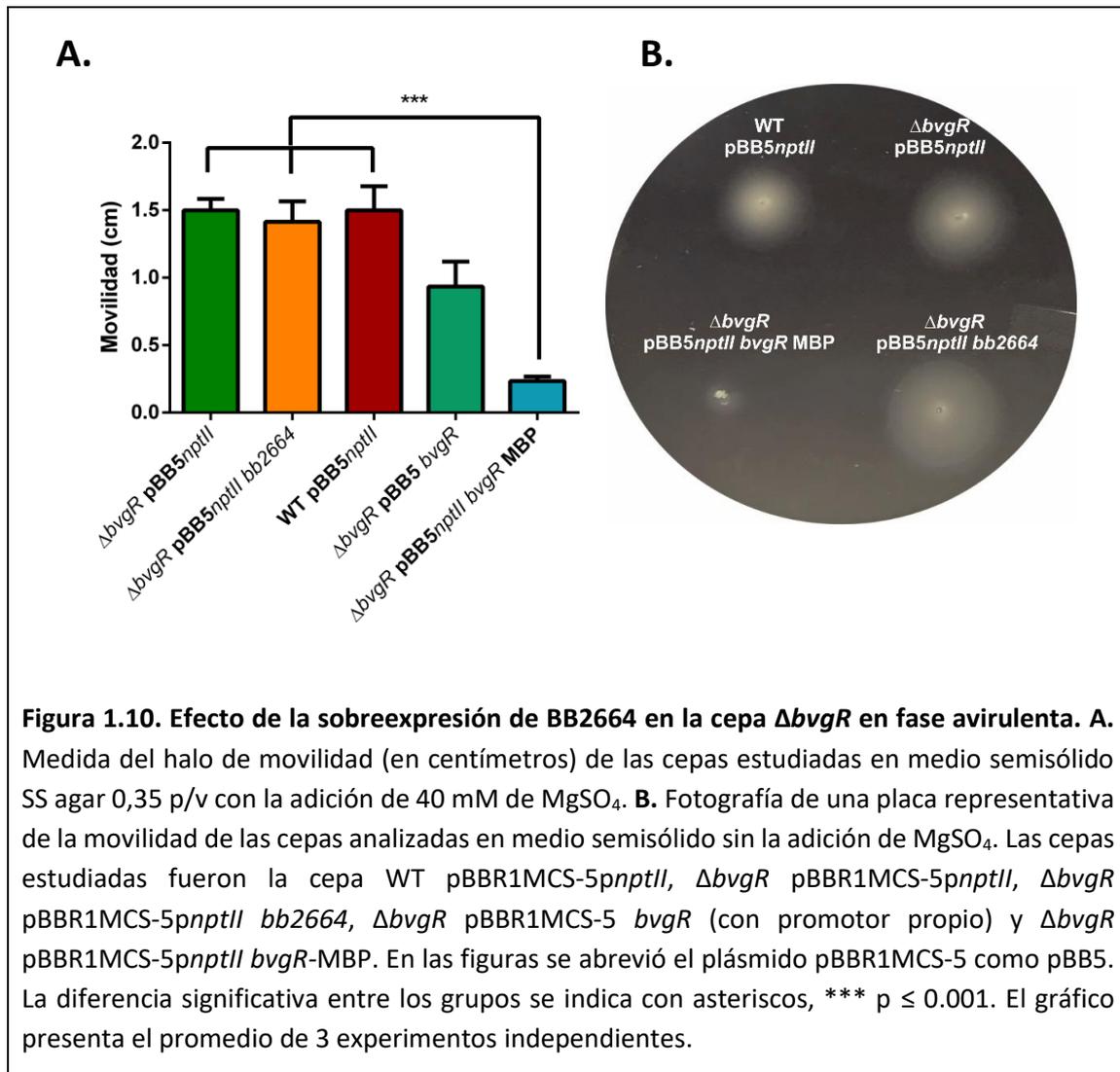
de este fenotipo, como ocurre cuando se deleta el gen de la fosfodiesterasa PdeH de *E. coli* (Reinders *et al.*, 2016). Otro ejemplo de esta situación es lo que ocurre con la fosfodiesterasa BB2664 en *B. bronchiseptica*. Nuestro grupo de investigación ha determinado que el gen *bb2664* codifica para una fosfodiesterasa activa, cuya sobreexpresión en *B. bronchiseptica* disminuye su capacidad de formar biofilm (manuscrito en producción).

Como se ha mencionado, un mutante en *bvgR* de *B. bronchiseptica* (tanto insercional como por delección) es capaz de moverse en agar blando aún en fase virulenta (en la que no debería expresar el flagelo). Este fenómeno no coincide con lo esperado para la mutación de una fosfodiesterasa. La sobreexpresión de BvgR revierte el fenotipo del mutante BvgR reprimiendo la movilidad en fase virulenta en el mutante BvgR. Inclusive, cuando BvgR se expresa desde la construcción pBBR1MCS-5*pnptII bvgR*-MBP es capaz de reprimir parcialmente la movilidad en fase avirulenta, como se describió en el punto anterior (1. b) c.).

Debido a la dificultad para purificar BvgR, nos planteamos hacer ensayos de complementación cruzada para evaluar si BvgR tiene actividad fosfodiesterasa. Si la regulación de la movilidad por parte de BvgR fuera gracias a una posible actividad fosfodiesterasa, la sobreexpresión de *bb2664* en el mutante BvgR resultaría en una regulación de la movilidad tipo *wild type* ya que la mutante se vería complementada por una fosfodiesterasa. Para poder resolver esta pregunta, se construyó la cepa $\Delta bvgR$ complementada con el plásmido pBBR1MCS-5*pnptII bb2664*. Como se puede observar en la Figura 1.9 la sobreexpresión de *bb2664* en la cepa $\Delta bvgR$ no revierte el fenotipo de movilidad en fase virulenta, sino que la cepa $\Delta bvgR$ pBBR1MCS-5*pnptII bb2664* nada ligera pero significativamente más que la cepa $\Delta bvgR$. Este fenómeno concuerda con el concepto de que la sobreexpresión de una fosfodiesterasa activa aumenta la movilidad de las bacterias en general y de *B. bronchiseptica* en particular. Por el contrario, la sobreexpresión de BvgR bajo su propio promotor ($\Delta bvgR$ pBBR1MCS-5 *bvgR*) así como bajo el control de un promotor fuerte y fusionada a MBP ($\Delta bvgR$ pBBR1MCS-5*pnptII bvgR*-MBP) revierten completamente el fenotipo del mutante, es decir que dichas cepas no presentan movilidad en fase virulenta, comportándose de manera indistinguible a la cepa *wild type* (Figura 1.9).



B. bronchiseptica wild type presenta movilidad en fase avirulenta. Esto se consigue en el laboratorio agregándole $MgSO_4$ 40 mM al medio de cultivo (Fernández *et al.*, 2005). Cuando realizamos los ensayos de movilidad en estas condiciones observamos que, tal como se había reportado previamente, al sobreexpresar *bvgR* desde su propio promotor la diferencia en el halo de movilidad medido no es estadísticamente significativa al medido en la cepa WT pBBR1MCS-5pnptII (Figura 1.10). Sin embargo, la cepa $\Delta bvgR$ pBBR1MCS-5pnptII bvgR-MBP es capaz de inhibir parcialmente la movilidad en medio semisólido, mientras que la sobreexpresión de *bb2664* no produce el mismo efecto, comportándose la cepa $\Delta bvgR$ pBBR1MCS-5pnptII bb2664 de manera similar a la cepa que contiene el plásmido vacío ($\Delta bvgR$ pBBR1MCS-5pnptII) (Figura 1.10). Vale recordar que la sobreexpresión de una fosfodiesterasa está asociada con un aumento en la movilidad y no con una disminución. Estos resultados confirman que BvgR no se comporta de manera análoga a una fosfodiesterasa activa, resultado que comprobamos tanto en fase virulenta como en fase avirulenta.



Conclusiones

El gen *bvgR*, que se encuentra adyacente a los genes *bvgA* y *bvgS* en el genoma de las clásicas *Bordetellas*, codifica para una proteína de 32 kDa. Esta proteína presenta un único dominio con características de dominio EAL. Este dominio EAL se encuentra ampliamente distribuido entre las bacterias Gram negativas y se asocia a la actividad fosfodiesterasa específica del segundo mensajero c-di-GMP.

A partir del análisis bioinformático llevado adelante en este trabajo de Tesis podemos concluir que la proteína codificada por *bvgR* correspondería a la categoría de proteínas con dominio EAL que no son capaces de degradar el c-di-GMP ya que no posee los aminoácidos conservados necesarios para presentar actividad fosfodiesterasa. No es posible determinar a

partir de los alineamientos de secuencia aminoacídicas si BvgR es capaz de unir c-di-GMP, ya que conserva algunos de los aminoácidos descritos por otros autores involucrados en la unión del sustrato, pero no todos. No obstante, dada la flexibilidad de la molécula de c-di-GMP es muy difícil estimar si puede unirse a una proteína basándose en su secuencia aminoacídica. Para determinar esto, deberían realizarse ensayos *in vitro* como la calorimetría isotérmica de titulación (ITC).

Algunas proteínas con dominio EAL sin actividad fosfodiesterasa pueden actuar como proteínas regulatorias de la movilidad al interactuar con el regulador maestro de la movilidad, FlhD. Nuevamente, nuestros resultados indican que BvgR no comparte este mecanismo de acción ya que no presenta los aminoácidos requeridos para la interacción con FlhD. De hecho, ninguna proteína con dominio EAL tiene homología con BvgR, razón por la cual resulta tan dificultoso determinar su función y mecanismo de acción mediante metodologías predictivas. Nuestra principal hipótesis es que BvgR no cumple su función reguladora de manera directa, ya que no sería capaz de degradar c-di-GMP ni tiene sitios de unión al ADN en su secuencia, sino que lo haría al interactuar con otras proteínas, proceso que podría o no requerir la unión de c-di-GMP a BvgR como regulador alostérico. De acuerdo a nuestro modelo estructural de BvgR, ésta presenta un plegamiento tipo *TIM-barrel* de ocho hebras, una de ellas en sentido antiparalelo, como se ha descrito para varios dominios EAL.

Los análisis bioinformáticos también sugirieron que BvgR es una proteína poco soluble, con numerosos aminoácidos hidrofóbicos en la superficie de la proteína. Estos resultados concuerdan con las dificultades que se han presentado durante los intentos de purificación de BvgR en *E. coli* y en *B. bronchiseptica*, tanto de nuestra parte como de otro grupo de investigación (Cróinin, Grippe and Merkel, 2005). La aparente poca solubilidad de BvgR refuerza nuestra hipótesis de que BvgR interactúa con otras proteínas, presentes en el citoplasma o en la membrana interna, y que permanece soluble gracias a éstas.

Dado nuestro interés en obtener a BvgR purificada para poder realizar distintos ensayos *in vitro* fuimos asesorados por investigadores del IBR especialistas en la expresión y purificación de proteínas. Ellos obtuvieron cuatro construcciones con BvgR fusionada a distintos dominios solubilizadores, que incluían una etiqueta de 6 histidinas. Logramos subclonar la construcción que presentó mejores resultados en *E. coli*, con BvgR fusionada a la *Maltose-Binding Protein* (MBP), en el plásmido replicativo en *B. bronchiseptica* pBBR1MCS-5 bajo el control del promotor fuerte, *pnptII*. A partir de este nuevo vector, pBBR1MCS-5 *pnptII* *bvgR*-MBP, se logró purificar BvgR de *B. bronchiseptica* mutante en *bvgR*, aunque no en grandes cantidades. Esta proteína no

sólo mantiene su función, ya que logra revertir el fenotipo de movilidad del mutante $\Delta bvgR$ en fase virulenta, sino que además parece tener una actividad exacerbada, ya que es capaz de reprimir la movilidad incluso en fase avirulenta, a diferencia de lo que ocurre con la complementación con BvgR-6His. Parecería que la fusión a MBP torna a BvgR aún más estable que su conformación *wild type* al sobreexpresarla.

Considerando que sin lograr obtener a la proteína BvgR purificada en grandes cantidades iba a ser imposible determinar la actividad fosfodiesterasa de manera directa, decidimos aplicar un enfoque distinto que nos permitiría inferir de manera indirecta si la proteína presenta dicha actividad.

Dicho enfoque consistió en complementar al mutante $\Delta bvgR$ con una fosfodiesterasa activa de *B. bronchiseptica*, BB2664, y evaluar si su sobreexpresión revierte el fenotipo de movilidad que presenta el mutante en fase virulenta. No sólo BB2664 no fue capaz de revertir el fenotipo del mutante, es decir, fue incapaz de reprimir la movilidad, sino que además su sobreexpresión incrementó la movilidad del mutante. El incremento en la movilidad por parte de una fosfodiesterasa es un fenotipo ya descrito en otras bacterias. Por el contrario, la sobreexpresión de BvgR bajo su propio promotor o bajo un promotor fuerte y fusionada a MBP sí reprimen la movilidad en fase virulenta. Por otro lado, la sobreexpresión de BvgR-MBP bajo el control de un promotor fuerte inhibe parcialmente la movilidad en fase avirulenta mientras que la sobreexpresión de BB2664 bajo el mismo promotor no presentó el mismo comportamiento.

Los resultados expuestos en este capítulo nos han brindado suficiente evidencia como para considerar a BvgR como una proteína con dominio EAL sin actividad fosfodiesterasa. Más aun, los resultados del estudio bioinformático de su estructura, junto a las dificultades de su purificación y los ensayos con BvgR fusionada a MBP, apoyan nuestra hipótesis de que BvgR ejerce su rol regulatorio a través de su interacción con una o más proteínas de *B. bronchiseptica*.

CAPITULO 2

Análisis transcriptómico de genes
diferencialmente regulados por BvgR

Introducción

BvgR es considerado un regulador negativo propio de la fase virulenta de la bacteria que reprime la expresión de genes de avirulencia (*vrgs* – de *virulence-repressed genes*). Sin embargo, esta represión no sería realizada de manera directa dado que no existe evidencia de que BvgR sea capaz de unirse al ADN y la secuencia aminoacídica de BvgR tampoco presenta ningún dominio de unión al ADN. A pesar de que se han publicado trabajos realizados con fusiones transcripcionales y *microarrays* para conocer qué genes regula BvgR en *Bordetella* spp., son pocos los genes que se han descrito de manera concisa.

En el primer reporte sobre BvgR (Merkel and Stibitz, 1995) se utilizaron fusiones transcripcionales con fosfatasa alcalina y se determinó que BvgR regula negativamente a *vrg-6* y a *vrg-73* en *B. pertussis*. En nuestro laboratorio, la Dra. Fernández reportó que el flagelo, uno de los principales *vrgs* de *B. bronchiseptica*, se encuentra bajo el control de BvgR (Fernández *et al.*, 2005). En un trabajo llevado adelante en el laboratorio del Dr. Locht estudiaron el regulón del factor transcripcional RisA y también analizaron mediante *microarray* los genes diferencialmente expresados entre una cepa de laboratorio de *B. pertussis* y su mutante en *bvgR*. En la publicación de dicho trabajo se reportaron unos 30 genes regulados por BvgR, entre los que se incluyeron genes del aparato flagelar y algunos genes ya reportados como *vrgs* (Coutte *et al.*, 2016).

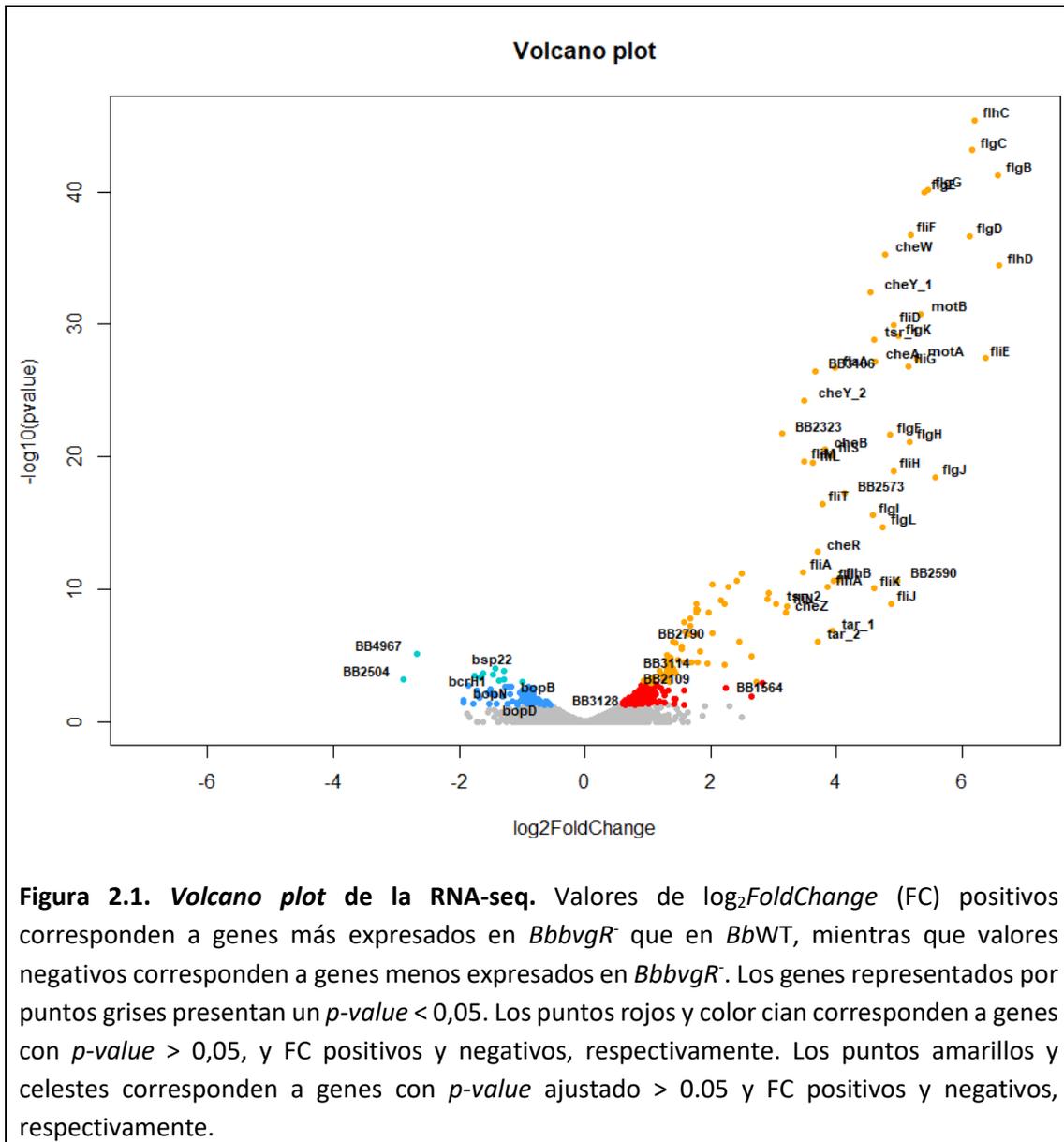
La aplicación de técnicas de secuenciación masiva como la secuenciación de ARN mensajeros (RNA-seq) permite actualmente comparar los niveles de transcriptos entre distintas cepas (o condiciones), a bajo costo y con una preparación de muestra de baja complejidad, brindando valiosa información acerca de la expresión diferencial entre dichas cepas. El secuenciamiento de ARN es una tecnología muy poderosa, cada vez más utilizada, que se estima que reemplazará el uso de los *microarrays* para análisis transcriptómicos en el futuro. Los *microarrays* tienen varias limitaciones: en principio, están limitados sólo al análisis de los genes para los cuales han sido diseñadas las sondas y éstas a su vez, difieren considerablemente en sus propiedades de hibridación. Además, los *microarrays* no resultan adecuados para detectar transcriptos poco abundantes, se saturan con aquellos de muy alta expresión y su exactitud se ve limitada por la hibridación inespecífica. En un estudio en el que compararon las técnicas de *microarray* y RNA-seq usando ARN de células T de memoria humanas, los autores concluyeron que la técnica de RNA-seq resultó altamente reproducible, más sensible para detectar genes con muy baja expresión y más exacta en la detección de transcriptos extremadamente abundantes,

es decir que tiene un rango de detección más amplio y resulta más eficiente a la hora de detectar cambios en la expresión de transcritos en condiciones diferentes (Zhao *et al.*, 2014)

1. Análisis transcriptómico

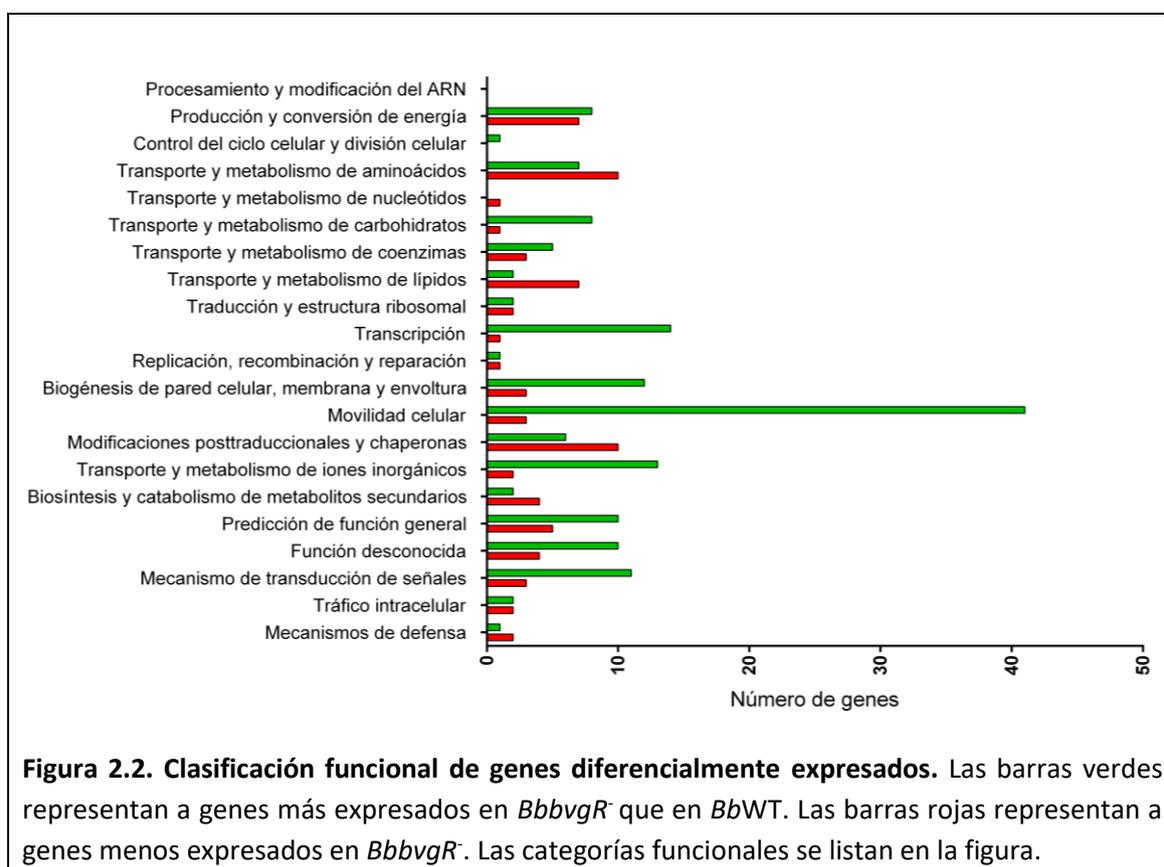
Con el objetivo de profundizar el conocimiento sobre cuáles son los genes regulados por BvgR en *B. bronchiseptica* se realizó la secuenciación masiva del ARN obtenido tanto de la cepa *wild type* como de la mutante insercional en *bvgR* (*BbbvgR*⁻). Para ello, se aisló y purificó el ARN obtenido de tres réplicas biológicas de cada cepa y se envió al servicio de secuenciamiento que utiliza la plataforma *Illumina HiSeq* en Marshall, USA. Allí se analizó inicialmente la calidad de las muestras, se prepararon las bibliotecas de ADNc con *Scriptseq* y posteriormente se realizó la secuenciación masiva (ver Materiales y Métodos para detalles metodológicos).

Se obtuvieron 25 millones de lecturas de 2x150 pb por muestra, las cuales fueron analizadas utilizando el software *CLC Genomics Workbench* 9.5.4. Las lecturas que superaron el puntaje de calidad determinado por la configuración estándar del programa fueron mapeadas contra el genoma de referencia de *B. bronchiseptica* RB50. Se consideraron como genes diferencialmente expresados de manera significativa a aquellos que presentaron un *p-value* menor a 0,05 (test EDGE). Específicamente, el análisis de la secuenciación reveló 319 genes diferencialmente expresados entre las cepas comparadas. De éstos, 221 presentaron una mayor expresión en el mutante *BbbvgR*⁻ que en la cepa *wild type*, mientras 98 genes presentaron un menor nivel de expresión en el mutante *BbbvgR*⁻ que en la cepa *wild type* (Figura 2.1). Los genes con mayor y menor expresión en *BbbvgR*⁻ respecto a *BbWT* con los valores de *fold changes* y *P-values*, así como su anotación, se listan en las Tablas C.1 y C.2 del Anexo III.



En primera instancia, los genes expresados diferencialmente de manera significativa fueron clasificados según su pertenencia a los grupos de genes ortólogos (COGs), los cuales se agrupan de acuerdo a las categorías funcionales de las proteínas, predichas a partir de la información conocida de proteínas ortólogas (Wu *et al.*, 2011). La distribución de dichos genes en las distintas categorías funcionales se representa en la Figura 2.2. Se puede observar que la categoría que agrupó la mayor cantidad de genes diferencialmente expresados fue la de movilidad celular (COG N), con 41 genes sobreexpresados en el mutante y 3, disminuidos. Adicionalmente se observó una gran cantidad de genes, con una mayor expresión en el mutante *BbbvgR*, asociados al proceso de transcripción (COG K – 15 genes), a mecanismos de modificación postranscripcional y a la actividad de chaperonas (COG O – 16 genes) y a mecanismos de

transducción de señales (COG T – 14 genes). Asimismo, se encontraron genes relacionados al transporte y metabolismo de aminoácidos (COG E – 17 genes), de lípidos (COG I – 9 genes), de carbohidratos (COG G – 9 genes), de coenzimas (COG H – 8 genes) y de iones inorgánicos (COG P – 15 genes), y genes asociados a la producción y conversión de energía (COG C – 15 genes) y a la biogénesis de la pared celular, de la membrana y de la envoltura (COG M – 15 genes). Por otro lado, se encontraron muy pocos genes asociados a las categorías de metabolitos secundarios (COG Q – 6 genes), tráfico intracelular (COG U – 4 genes), mecanismos de defensa (COG V - 3 genes), control del ciclo celular (COG D – 1 gen), replicación, recombinación y reparación de ADN (COG L – 2 genes) y traducción y estructura ribosomal (COG J – 4 genes). Por último, no se encontró ningún gen perteneciente a la categoría de procesamiento de ARN mientras 29 genes se ubicaron en la categoría de proteínas hipotéticas de función desconocida.



Al analizar la distribución de los genes diferencialmente expresados en el *volcano plot*, lo primero que se puede observar es que el mutante *BbbvgR* presentó más genes con expresión aumentada (valores de $\log_2\text{FoldChange}$ positivos) que con expresión disminuida (valores de $\log_2\text{FoldChange}$ negativos) respecto a la cepa *wild type*. Además, se ve que los genes con mayor

fold change en la comparación están sobreexpresados en el mutante *BbbvgR*⁻, principalmente relacionados con la movilidad en *B. bronchiseptica*. El máximo *fold change* encontrado fue de 98 y corresponde al regulador maestro del operón del flagelo, *flhD*. Por su parte, todos los genes con expresión disminuida en el mutante *BbbvgR*⁻ presentaron valores de *fold change* menores a 7. Todo esto sugiere que el principal rol de BvgR sería el de una proteína represora de la expresión de genes, tal como se había observado hasta el momento.

Posteriormente, se realizó un análisis de interacciones proteína-proteína sobre los conjuntos de genes con expresión aumentada o disminuida en el mutante *BbbvgR*⁻. Para ello se utilizó la herramienta bioinformática STRING siguiendo la configuración estándar. STRING es una base de datos de interacciones proteína-proteína, conocidas y predichas, que permite predecir interacciones presentes en un conjunto de proteínas basándose en la participación en una misma vía metabólica o proceso celular, contexto genómico, co-expresión y datos bibliográficos. En las Figuras 2.3 y 2.4 se pueden observar las redes de asociaciones predichas para los genes aumentados y disminuidos en el mutante *BbbvgR*⁻, respectivamente.

En la Figura 2.3, que ilustra las interacciones entre los genes sobreexpresados en *BbbvgR*⁻, se pueden ver dos clusters grandes en la región central, correspondientes a genes de los operones flagelares y de quimiotaxis (color rojo) y a genes relacionados al metabolismo de c-di-GMP (color naranja). Las líneas que conectan estos clusters ilustran la interacción entre ambos grupos. Nuestro grupo ya ha reportado que la concentración intracelular de c-di-GMP regula la movilidad de *B. bronchiseptica* (Sisti *et al.*, 2013; Belhart *et al.*, 2019). Además, hay pequeños clusters que corresponden a genes relacionados con la transcripción: *rpoZ*, *rpsU*, *greA* y *BB3074* (en violeta); los genes *BB0906-BB0913*, agrupados en color fucsia, están relacionados con modificaciones del ADN (helicasa, enzimas de restricción tipo III, etc); los genes *BB0483-BB0486* (en gris) que codifican para proteínas no caracterizadas, y por último, los genes *BB0163-BB0167* (en verde) están anotados como genes de proteínas de membrana relacionadas al mantenimiento de ésta por la vía Mla (*maintenance of lipid asymmetry*).

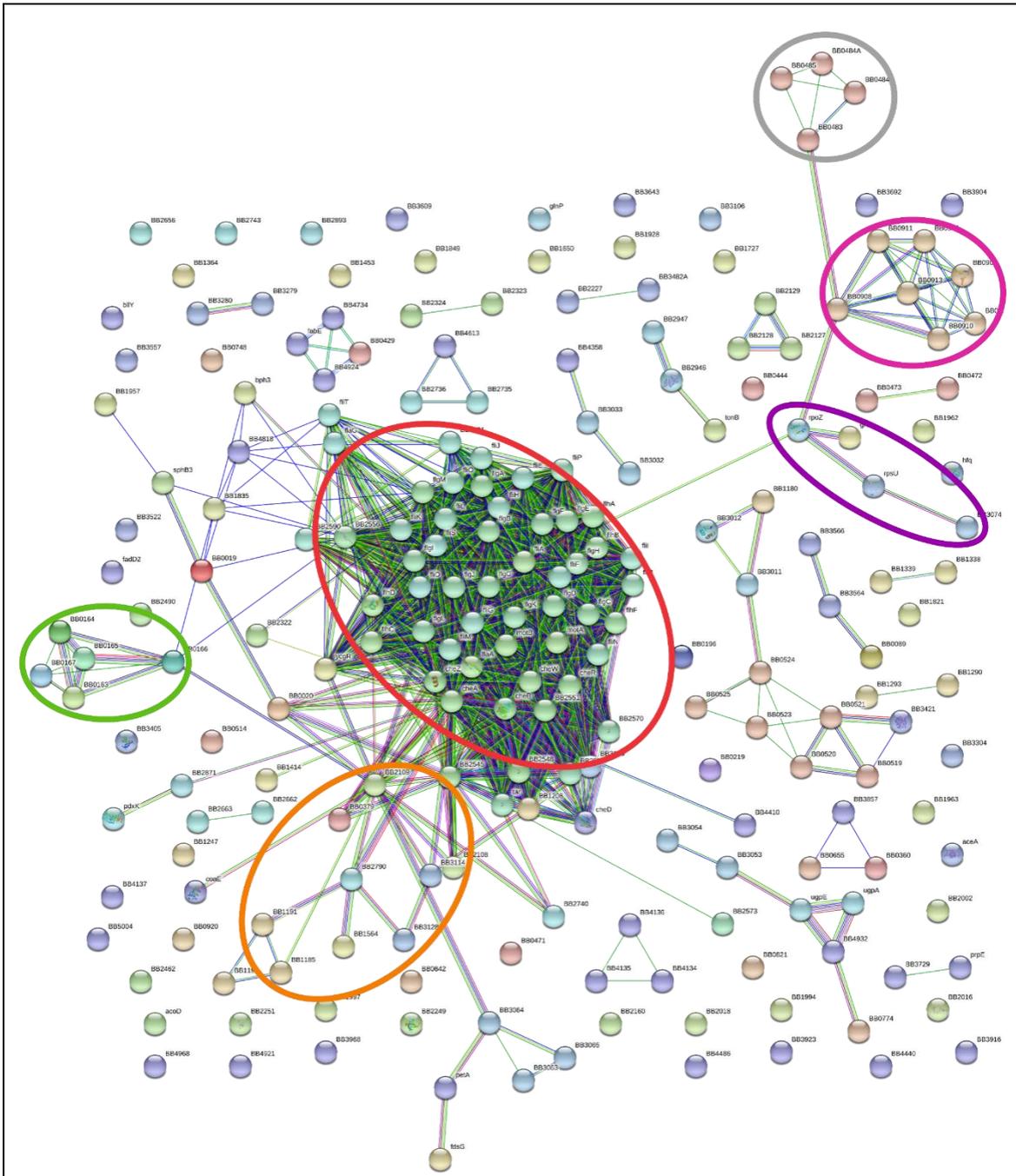
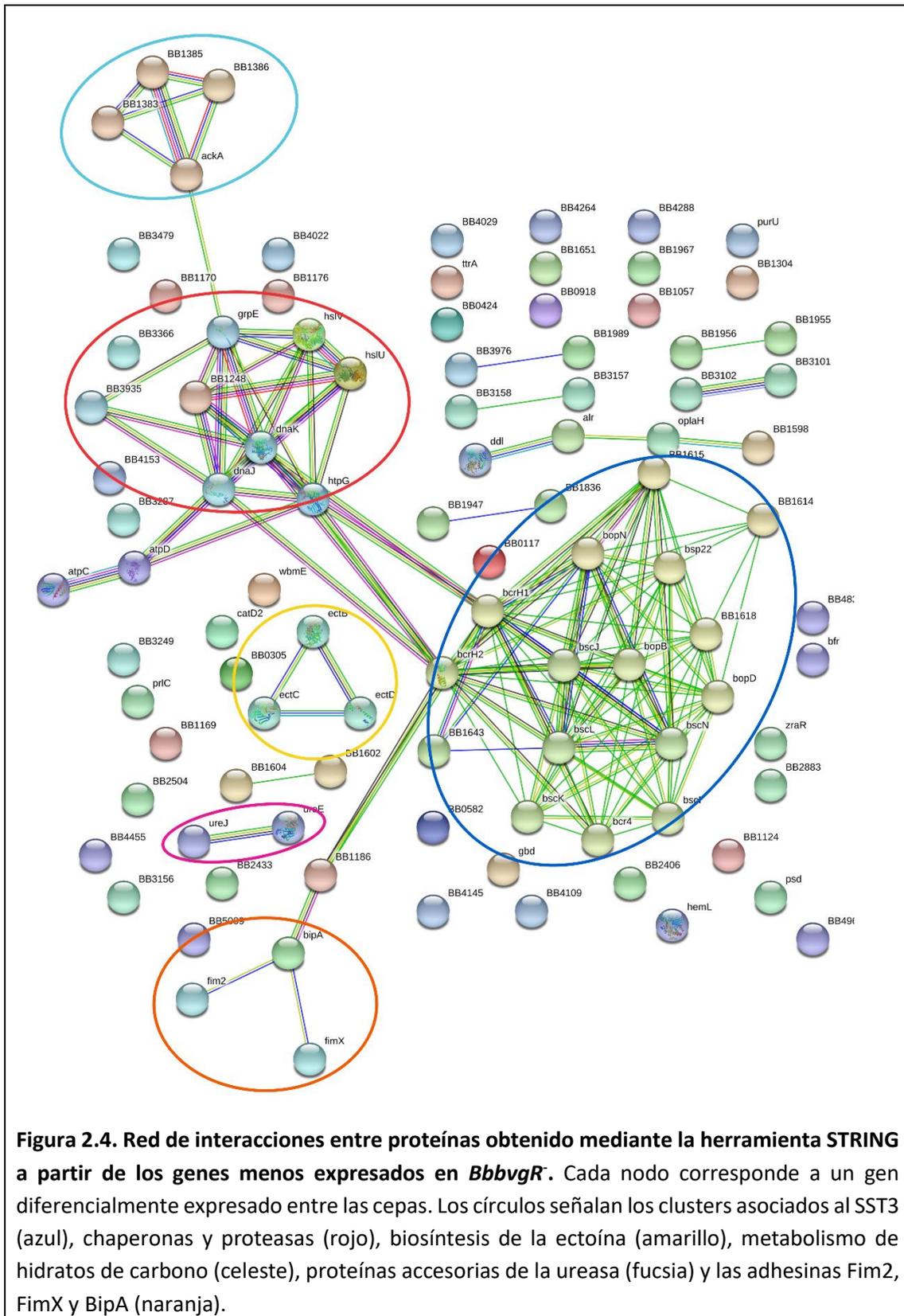


Figura 2.3. Red de interacciones entre proteínas obtenida mediante la herramienta STRING a partir de los genes sobreexpresados en *BbbvgR*. Cada nodo corresponde a un gen diferencialmente expresado entre las cepas. Los círculos señalan los clusters asociados a quimiotaxis y genes flagelares (rojo), metabolismo de c-di-GMP (naranja), transcripción (violeta), modificaciones del ADN (fucsia), vía de Mla (verde) y proteínas no caracterizadas (gris).

La Figura 2.4 representa la red de interacciones entre las proteínas correspondientes a los genes con menor expresión en *BbbvgR* que en la cepa *wild type*. Se observa un gran cluster que corresponde a los genes del sistema de secreción tipo III de *Bordetella* (color azul) conectado a

un cluster compuesto por los genes de las chaperonas GrpE, DnaJ, DnaK, HtpG, de las proteasas HslV, HslU y BB1248 (proteasa Lon), y de una tiorredoxina putativa, BB3935 (cluster color rojo). Excepto esta última proteína que no ha sido caracterizada, el resto de las proteínas del cluster marcado en rojo participan activamente en respuesta a estreses en otras bacterias. DnaK, DnaJ y GrpE son chaperonas que forman una maquinaria celular que repliega proteínas desnaturalizadas por calor (Schröder *et al.*, 1993), HslU y HslV forman un complejo proteasa ATP-dependiente que degrada proteínas mal plegadas (Rohrwild *et al.*, 1996). Lon es una proteasa dependiente de ATP que degrada tanto proteínas mal plegadas como proteínas específicas como parte de un sistema regulatorio que se ha visto que regula numerosos fenotipos y hasta modifica los niveles de c-di-GMP en *V. cholerae*. (Rogers *et al.*, 2016). También se puede observar a los genes de las enzimas responsables de la biosíntesis de la ectoína, compuesto que interviene en la resistencia al estrés osmótico (*ectCBD* en color amarillo); a *BB1383-BB1386* y *ackA* (en celeste) que son genes del metabolismo de los hidratos de carbono; a los de las fimbrias FimX y Fim2, junto al de la adhesina BipA (color naranja) y a los genes de proteínas accesorias de la ureasa (*ureE* y *ureJ* en fucsia). La ureasa de *B. bronchiseptica* está compuesta por tres subunidades, UreABC, y cuenta con dos proteínas accesorias UreEF, codificadas por el operón *ureEF*, que son necesarias para la activación de la ureasa (Kim, Mulrooney and Hausinger, 2006). Nuestra RNA-seq detectó una disminución en los transcritos de *ureE*, pero no de *ureF*, y de *ureJ*, proteína cuya función es desconocida. En *B. bronchiseptica* la ureasa ha sido descrita como un *vrg* aunque parece tener un mecanismo de regulación complejo ya que su expresión aumenta en presencia de MgSO₄ pero no con una disminución en la temperatura (30°C), como otros *vrgs* (McMillan *et al.*, 1996).



A continuación, se detallarán las categorías que resultaron sobresalientes en este análisis.

a. Genes involucrados en la movilidad celular

Previamente se mencionó que BvgR regula la expresión de la flagelina en *B. bronchiseptica* (Fernández *et al.*, 2005). Si bien era esperable dada la estructura regulatoria de los genes flagelares, el ensayo transcriptómico realizado en este trabajo de Tesis evidenció que no sólo el gen de la flagelina, *fliC*, estaba sobreexpresado en el mutante *BbbvgR*, sino que también lo estaban 45 de los 46 genes que constituyen los tres operones de la cascada regulatoria del flagelo, incluyendo a los reguladores maestro *flhCD* (Figura 2.5). Esto indica que la regulación por parte de BvgR actúa a nivel transcripcional sobre el primer escalón de la cascada regulatoria del flagelo.

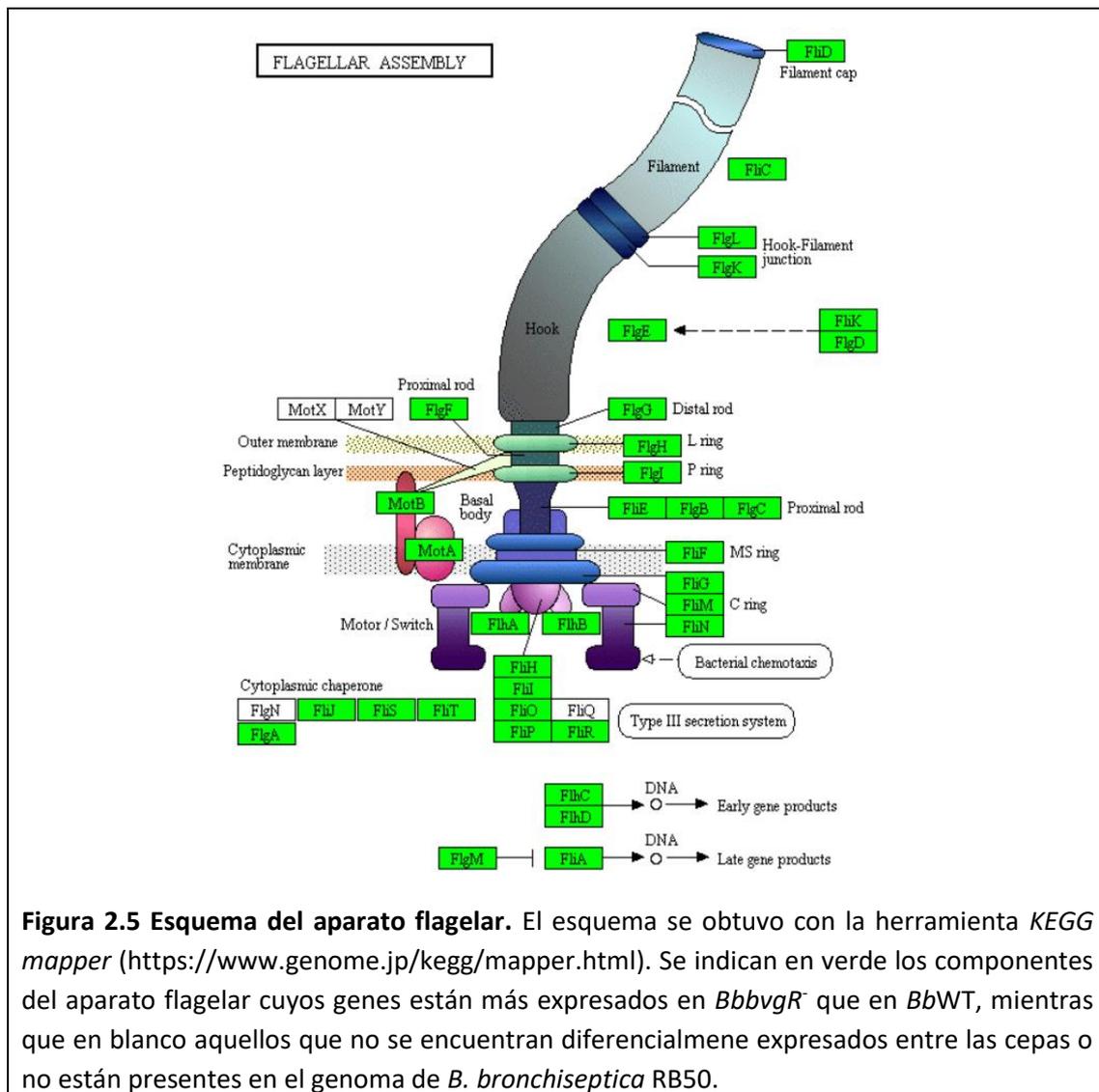


Figura 2.5 Esquema del aparato flagelar. El esquema se obtuvo con la herramienta *KEGG mapper* (<https://www.genome.jp/kegg/mapper.html>). Se indican en verde los componentes del aparato flagelar cuyos genes están más expresados en *BbbvgR* que en *BbWT*, mientras que en blanco aquellos que no se encuentran diferencialmente expresados entre las cepas o no están presentes en el genoma de *B. bronchiseptica* RB50.

b. Genes involucrados en el metabolismo de c-di-GMP

El siguiente grupo de interés que puede apreciarse en el *volcano plot* y en el análisis por STRING es el correspondiente a ciertos genes relacionados con el metabolismo de c-di-GMP, todos ellos más expresados en el mutante *BbbvgR* que en la cepa *wild type*. Específicamente, encontramos genes que codificarían para una proteína con un dominio EAL (BB3128), dos con dominio GGDEF (BB2790 y BB3114), una con ambos dominios EAL y GGDEF (BB2109) y una con dominio HD-GYP (BB1564). Adicionalmente se encontraron sobreexpresados en la cepa mutante *BbbvgR* genes que podrían estar relacionados con el metabolismo de c-di-GMP ya sea por su homología a proteínas que interactúan con c-di-GMP, como el caso de *BB1561* (homóloga a PilZ), o bien por su cercanía en el genoma a proteínas del metabolismo de c-di-GMP, como los casos de *BB3115* (que se encuentra entre el gen de la proteína con dominio GGDEF BB3114 y el gen de la proteína con dominio EAL BB3116) y de *BB1185*, *BB1190* y *BB1191* (genes que forman parte del sistema Lap) (Ambrosis *et al.*, 2016).

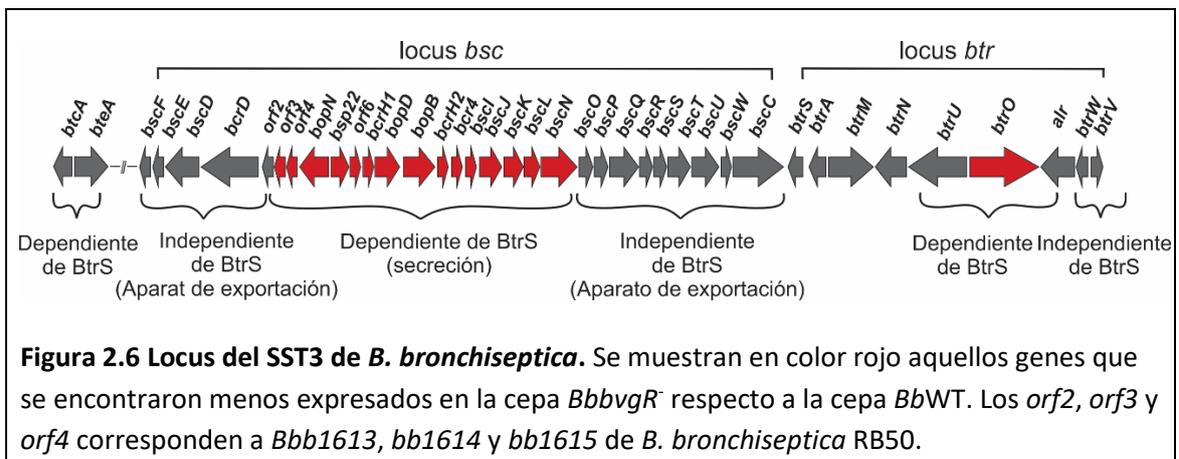
Resulta interesante, además, que 46 genes de los 98 que presentaron menor expresión en *BbbvgR* fueron encontrados también menos expresados en una cepa con altos niveles de c-di-GMP respecto a la cepa WT en un ensayo transcriptómico llevado adelante en nuestro laboratorio (manuscrito en preparación). En este subgrupo de 46 genes se destacan 11 genes del SST3 y así como los de las proteasas HslU, HslV, y Lon; los de las chaperonas DnaJ, DnaK y HtpG; y los genes *ureE* y *ureJ*.

Si bien ya se había descrito que el sistema BvgAS controla la expresión de algunos genes relacionados al metabolismo de c-di-GMP (Belhart *et al.*, 2019), nuestro resultado sugiere que dicha regulación podría ser más fina. El dominio EAL de BvgR, que acorde a nuestro análisis bioinformático no es catalíticamente activo, aún podría ser capaz de unir c-di-GMP. Nuestra hipótesis es que BvgR representa un nivel de regulación adicional al sistema BvgAS, que en función de los niveles intracelulares de c-di-GMP regula la expresión de genes involucrados en el metabolismo de c-di-GMP, los cuales a su vez afectan múltiples procesos celulares.

c. Genes del SST3

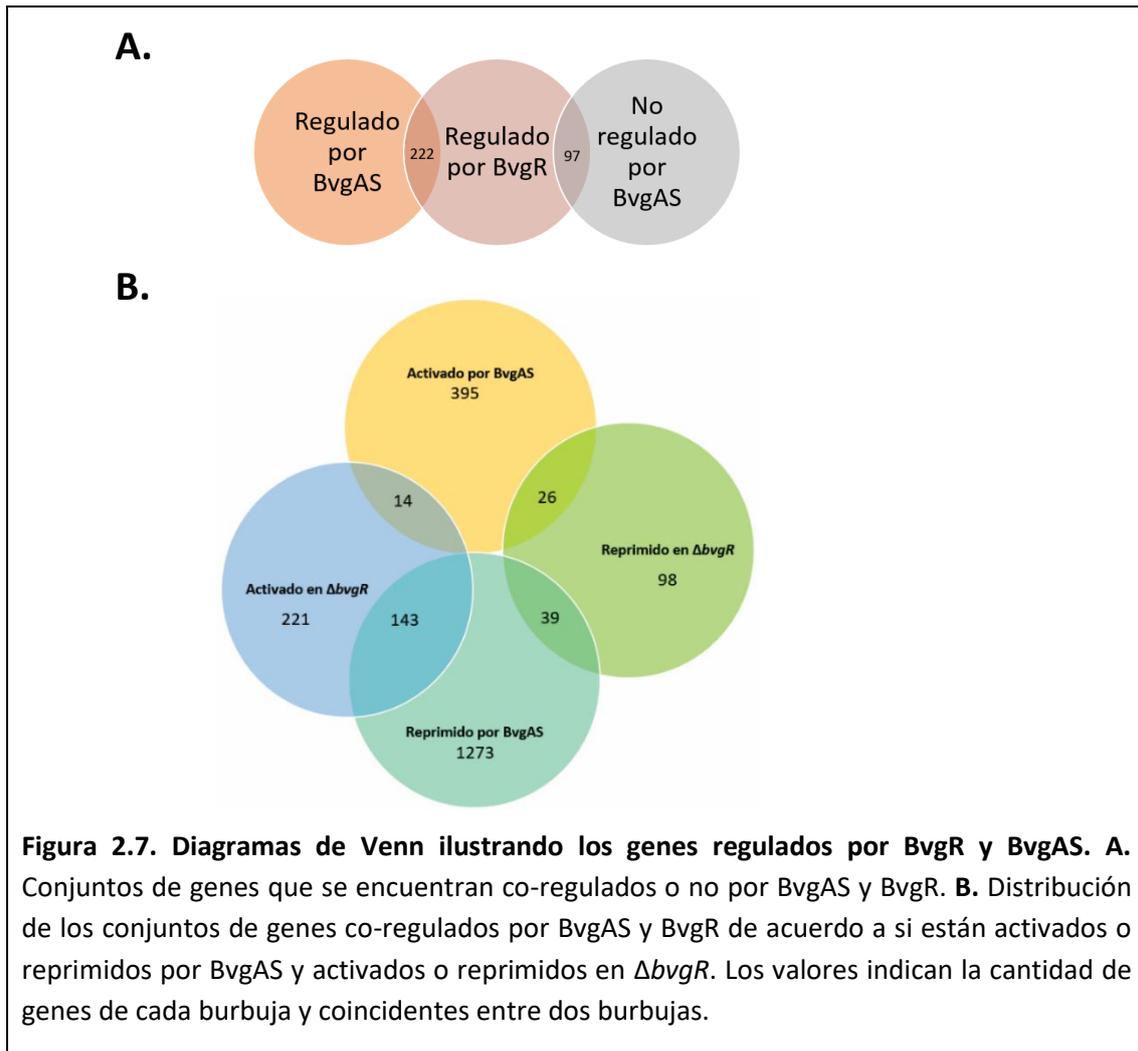
Dentro de los 98 genes cuya expresión está reducida en el mutante *BbbvgR* respecto a la cepa *wild type*, el grupo que más se destaca incluye 15 genes pertenecientes al sistema de secreción tipo III (SST3). El SST3 de *Bordetella* spp. se compone por un total de 34 genes

ordenados en 2 loci: el locus *bsc* y el locus *btr*. Como se puede observar en la Figura 2.6, y tal como describió Ahuja y colaboradores, la transcripción de estos genes puede o no requerir el factor sigma de función extra-citoplasmática (ECF) BtrS, el cual está codificado por un gen activado por BvgAS y es reprimido por un factor anti-sigma, BtrA/BspR. Catorce de los genes con expresión disminuida en el mutante *BbbvgR* corresponden al subgrupo del locus *bsc* responsable de la secreción que es BtrS-dependiente, mientras que *btrO* es el único gen dependiente de BtrS en el locus *btr*. No obstante, BtrS y BtrA se encontraron expresados de igual manera entre ambas cepas por lo cual la regulación por BvgR sería independiente de BtrAS.



d. Comparación con estudios anteriores

Una comparación exhaustiva de la lista de genes encontrados con datos previamente publicados nos indicó que algunos genes regulados por BvgR parecían no estar regulados por el sistema de dos componentes BvgAS (Cummings *et al.*, 2006; Nicholson, 2007). Este resultado nos incitó a comparar todos los genes diferencialmente expresados en el mutante *BbbvgR* con la lista de genes de *B. bronchiseptica* regulados por el sistema de dos componentes BvgAS, tal como reportaron Nicholson y Cumming (Cummings *et al.*, 2006; Nicholson, 2007). La lógica tras este análisis es que BvgR es un gen regulado positivamente por el sistema BvgAS y entonces, se esperaría que aquellos genes regulados por BvgR a su vez se encuentren regulados por el sistema BvgAS. La comparación entre nuestros datos y los reportados por Nicholson y por Cumming nos mostró que del total de genes regulados por BvgR (319), 97 no se encuentran bajo la regulación de BvgAS mientras que 222 sí (Figura 2.7, panel A).



Dentro de los genes sobreexpresados en el mutante *BbbvgR*⁻ (Figura 2.7, panel B):

- 143 están regulados negativamente por el sistema BvgAS. Este resultado es esperable para aquellos genes reprimidos por BvgR, ya que cuando BvgA activa BvgR, esta proteína media la represión de estos genes.
- 14 están regulados positivamente por el sistema BvgAS. Estos genes están reprimidos por BvgR, pero probablemente requieran de genes activados por BvgAS para su transcripción, ya que se expresan a un menor nivel cuando el sistema BvgAS está apagado.

Dentro de los genes con expresión disminuida en el mutante *BbbvgR*⁻:

- 26 genes están regulados positivamente por BvgAS. Este sería el caso de genes cuya transcripción se ve estimulada (directa o indirectamente) por la acción de BvgR (activado por BvgAS).
- 39 están regulados negativamente por BvgAS. La expresión de estos genes está incrementada en presencia de BvgR pero probablemente, proteínas activadas por BvgAS actúen como represoras.

Resultan muy interesantes aquellos genes que no fueron reportados como regulados por BvgAS pero que sí son regulados por BvgR según nuestros resultados de RNA-seq, que se listan en la Tabla C.3 (Anexo III). Entre ellos podemos ver a los genes de las chaperonas DnaJK y de las proteasas HslUV y Lon, los cuales presentan expresión disminuida en el mutante *BbbvgR*- pero no están reguladas por BvgAS según los datos bibliográficos.

A continuación, se compararon nuestros resultados de RNA-seq con los resultados de un *microarray* en *B. pertussis* que compara la cepa BPSM (*wild type*, adaptada a laboratorio) con un mutante en *bvgR*. Este ensayo formó parte del estudio de Coutte y colaboradores acerca del sistema RisA, que también regula la expresión de genes de avirulencia en *Bordetella*. En dicho trabajo encontraron 30 genes expresados de manera diferencial entre BPSM y su mutante en *bvgR*, los cuales incluyeron 16 genes pertenecientes a los operones flagelares, *vrg-6*, *vrg-73*, *fim3*, genes que codifican para enzimas involucradas en la síntesis del polisacárido de la cápsula y genes no caracterizados (Coutte *et al.*, 2016).

Respecto a los genes de los operones flagelares y de quimiotaxis, los autores no profundizaron al respecto, probablemente debido a que para la fecha de publicación del trabajo (2016) se pensaba que *B. pertussis* no expresaba el flagelo y que los genes flagelares eran vestigios evolutivos. Actualmente se sabe que *B. pertussis* mantuvo la capacidad de nadar aunque las condiciones en las que lo hace no resultan claras (Hoffman *et al.*, 2019). Una reinterpretación nuestra de los datos del trabajo de Coutte nos lleva a pensar que BvgR también regularía la expresión del flagelo en *B. pertussis* y que formaría parte del mecanismo de regulación de la movilidad en esta bacteria, que resulta aún más complejo que en *B. bronchiseptica*.

Por su parte, *vrg-6* y *vrg-73* forman parte del primer grupo de genes reportados como *vrgs* (*vrg-6*, *vrg-18*, *vrg-24*, *vrg-53*, *vrg-73*) (Knappt and Mekalanos, 1988). Desde entonces, no se ha estudiado en profundidad el rol de estas proteínas. Se ha especulado que los productos de los genes *vrg* podrían estar involucrados en el establecimiento de la infección o en la sobrevivencia de

la bacteria en el huésped o fuera de él, aunque hasta el momento no hay evidencia científica que respalde esta especulación.

En nuestro trabajo de RNA-seq no se observaron diferencias en la expresión de *vrg-6* entre la cepa *wild type* y la mutante en *bvgR*, pero los niveles de lectura en ambas fueron muy bajos, cercanos a las 15 lecturas (puede compararse con los genes de la toxina pertussis *ptx* que no se expresan en *B. bronchiseptica* que tuvieron cerca de 5 lecturas y con el gen *bvgA* que tuvo cerca de 1000 lecturas). Esto concuerda con el hecho de que la RNA-seq se realizó en muestras de RNA obtenidas de bacterias en fase virulenta, sin la presencia de moduladores y que no deberían expresar *vrgs* o deberían hacerlo en muy bajos niveles. La diferencia en el resultado de nuestro ensayo transcriptómico con el *microarray* realizado por Coutte y colaboradores sobre la participación de BvgR en la regulación de la expresión de *vrg-6* puede atribuirse a la diferencia entre las especies estudiadas: aunque *B. bronchiseptica* resulta un buen modelo para estudiar los procesos de patogénesis de las clásicas *Bordetella* y suele considerarse un ancestro evolutivo de *B. pertussis*, existen muchas diferencias entre estas especies.

La regulación de los *vrgs* en *Bordetella* es controversial. Beattie y colaboradores reportaron que sólo cuatro de los cinco *vrgs* (*vrg-6*, *vrg-18*, *vrg-24* y *vrg-53*) en *B. pertussis* contienen una secuencia conservada de 32 pb dentro de la región codificante (Beattie, Mahan and Mekalanos, 1993). Ellos demostraron que dicha secuencia de 32 pb, pero no la región promotora, debía estar intacta para que los genes sean sensibles a la modulación. Mediante la técnica de *South-Western blot* detectaron una proteína de 34 kDa que se unía a este elemento génico, aunque descartaron que dicha proteína fuera BvgR. Por el contrario, *vrg-73* parece no contener dicho elemento de 32 pb en su región codificante y, por lo tanto, es probable que cuente con un mecanismo de regulación diferente.

En este sentido, los homólogos de *vrg-18*, *vrg-24* ni *vrg-53* en *B. bronchiseptica*, al igual que *vrg-6*, no tienen una expresión diferencial en el mutante *BbbvgR* mientras que sí la tiene el gen homólogo de *vrg-73*, codificado por *bb4613*. La expresión de este gen presentó un aumento estadísticamente significativo en la cepa mutante en *bvgR* respecto a la WT, en la cual su nivel de expresión es bajo debido a que el estudio transcriptómico se llevó adelante en fase virulenta. El hecho de que *vrg-73* sí presentase una expresión diferencial entre las cepas estudiadas, pero no así *vrg-6*, es consistente con la idea de que estos *vrgs* están regulados por distintos mecanismos en los cuales podrían estar involucrados distintos sets de proteínas.

Por otro lado, aunque la proteína BvgR se encuentre conservada en las clásicas *Bordetellas*, no todos los genes regulados por BvgR en *B. bronchiseptica* están también presentes en *B. pertussis* y en *B. parapertussis*. De los genes diferencialmente expresados entre las cepas analizadas de *B. bronchiseptica*, son 61 los que no cuentan con homólogos en *B. pertussis*, 21 de ellos menos expresados y 39 más expresados en el mutante *BbbvgR*⁻. En lo que respecta a *B. parapertussis*, 15 genes diferencialmente expresados en nuestra comparación no se encuentran en ninguna cepa secuenciada de *B. parapertussis* mientras que 8 únicamente se encuentran en la cepa *B. parapertussis* Bpp5, de origen ovino.

Dentro de los resultados de nuestra RNA-seq encontramos genes relacionados con la virulencia de *B. bronchiseptica*, como los del SST3 y las fimbrias, por lo cual comparamos nuestra secuenciación con un análisis de expresión *in vivo* de *B. bronchiseptica* durante una infección en ratas mediante la técnica *In vivo Expressed-tag ImmunoPrecipitation* (IVET-PI) (Abe *et al.*, 2015). Resulta interesante que 12 de los genes con expresión diferencial en nuestra RNA-seq se encontraron inducidos *in vivo* en ratas, según los datos publicados por Abe y colaboradores (Abe *et al.*, 2015). Ocho de ellos estaban más expresados en el mutante *BbbvgR*⁻ que en la cepa *wild type*: *bb0655*, *bb3053*, *bb4410*, *bb2740*, *bb0523*, *bb4613*, *bb3522* y *bb2490*. Estos últimos dos genes están anotados como proteínas de fagos. Un total de 6 genes más expresados en el mutante *BbbvgR*⁻ están anotados como proteínas de fagos (*bb2227*, *bb2490*, *bb3482A*, *bb3522*, *bb3643* y *bb3609*). El resto de los genes corresponden a proteínas de carácter regulatorio (*bb0655* y *bb2740*), una ferredoxina (*bb0523*), una proteína hipotética conservada (*bb4410*), una proteína exportada putativa (*bb3053*) y a *vrg-73* (*bb4613*). Por otro lado, la expresión de cuatro de los genes inducidos *in vivo* en ratas se encontró disminuida en el mutante *BbbvgR*⁻: *bb1186*, *bb1169*, *bb1170* y *bb1989*. *bb1170* y *bb1989* codifican para proteínas hipotéticas mientras que *bb1169* codifica para un regulador transcripcional de la familia AsnC. Por su parte, *bb1186* codifica para una adhesina, BrtA, que forma parte del sistema Lap de *B. bronchiseptica* involucrado en la formación de biofilm y que fue reportado como un *vrg* reprimido por BvgR (Nishikawa *et al.*, 2016). *brtA* forma parte de un operón junto a *bb1185* (LapG) y a *bb1184* (LapD) (Ambrosis *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta que *bb1185* se encuentra sobreexpresada en el mutante *BbbvgR*⁻ y lo reportado por Nishikawa, nos sorprendió no encontrar diferencias en la expresión de *brtA*. El gen *brtA* tiene una longitud de 10.038 pb y posee en su mitad inicial varias secuencias repetitivas (Ambrosis *et al.*, 2016). Esto sumado al alto contenido de GC normalmente presente en el genoma de *Bordetella* podrían explicar que no se hayan secuenciado mensajeros para este gen. Por otro lado, encontramos sobreexpresados a genes que forman parte del SST1 por el cual la adhesina BrtA es secretada (*bb1191-toIC* y *bb1190*, con

fold changes de 4). Estos resultados en su conjunto confirmarían que el sistema de proteínas Lap en *B. bronchiseptica* está negativamente regulado por BvgR.

Como se mencionó anteriormente, *bipA* está menos expresada en la mutante *BbbvgR*⁻ que en la cepa *wild type*. BipA es una proteína de fase intermedia que presenta su máxima expresión en dicha fase, mientras que en fase virulenta presenta una baja expresión y en fase avirulenta su expresión es indetectable (Stockbauer *et al.*, 2001). Como era esperable para las condiciones en las que se realizó este ensayo, el nivel de expresión de *bipA* en la cepa *wild type* fue baja. La expresión de *bipA* en el mutante *BbbvgR*⁻ fue aún menor, siendo la mitad de la de la cepa *wild type* (88 lecturas en la cepa WT y 42 en la mutante *BbbvgR*⁻). La secuencia de BipA es similar a las de las intiminas de *E. coli* enteropatogénica y *E. coli* enterohemorrágica, y a la de la invasina de *Yersinia* spp., proteínas que median la adhesión bacteriana a las células del huésped (Stockbauer *et al.*, 2001).

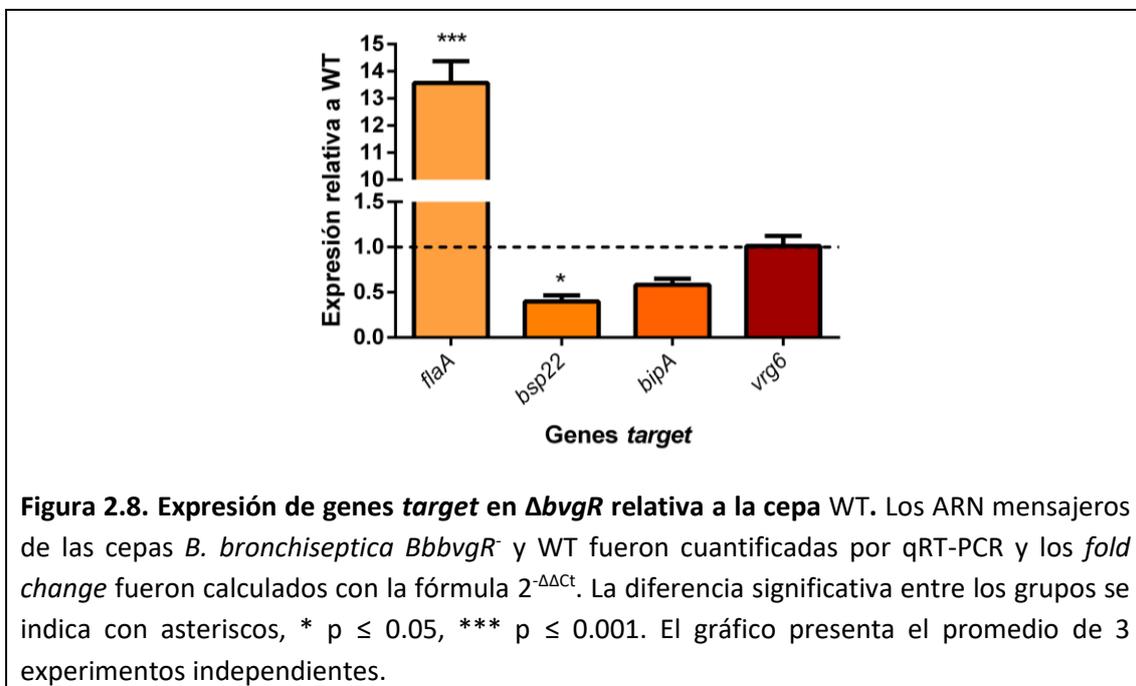
Por otro lado, en el laboratorio del Dr. Deora realizaron un análisis transcripcional comparando a las células de *B. bronchiseptica* en biofilm y en estado planctónico a distintos tiempos (Nicholson, Conover and Deora, 2012b). Observaron que varios genes regulados positivamente por BvgAS se encontraban reprimidos a las 6 horas, mientras que algunos regulados negativamente por dicho sistema estaban inducidos. Específicamente, encontraron los genes involucrados en la movilidad de *B. bronchiseptica* aumentados mientras que *bvgR*, *bvgS*, *cyaA*, *fhaB* y *bopD* se encontraron reprimidos. Por su parte, *bipA* y *bvgA* se encontraron igual de expresados en biofilm que en estado planctónico a ese tiempo. Nuestro resultado de RNA-seq concuerda con lo reportado por Deora, ya que nuestro mutante *BbbvgR*⁻ presenta los genes de movilidad aumentados y los del SST3 disminuidos. Asimismo, el transcriptoma de *B. bronchiseptica* durante la formación de biofilm presenta un patrón de expresión finamente regulado. Algunos de los genes anotados como reguladores transcripcionales que se encuentran regulados por BvgR de acuerdo a nuestra RNA-seq, también se encuentran diferencialmente expresados en algún punto durante el proceso de formación de biofilm, como *cspA*, *greA*, *bb2016*, *bb3114*, *bb4968* y *bcrH2* (Nicholson, Conover and Deora, 2012a).

2. Validación de resultados

Para corroborar los resultados obtenidos en la RNA-seq se realizaron ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Se eligieron cuatro genes de interés de acuerdo a su función en *B. bronchiseptica*, correspondientes a los grupos con mayor (*flaA*) y menor expresión

(*bsp22* y *bipA*) en el mutante *BbbvgR*⁻ comparado a la cepa *wild type* y con la misma expresión entre ambas cepas (*vrg-6*). Para ello, se extrajo el ARN de ambas cepas, se purificó y se llevó adelante la síntesis del ADN complementario de los genes *target*. Finalmente, se cuantificaron los ARN mensajeros mediante qRT-PCR y se utilizó al gen *recA* como gen de referencia.

Como se muestra en la Figura 2.8, efectivamente la expresión de *flaA* y de *bsp22* se correspondió con los datos de la RNA-seq, es decir que el nivel de transcritos de *flaA* presentó un incremento en el mutante *BbbvgR*⁻ respecto de la cepa *wild type*, mientras que el de *bsp22* una disminución. Por su parte, no pudimos observar cambios estadísticamente significativos para la expresión de *bipA*. Por último, la expresión de *vrg-6* no mostró diferencias significativas entre las cepas, al igual que el ensayo de RNA-seq.



Conclusiones

La fase avirulenta de *B. bronchiseptica* se caracteriza por la represión de los genes activados por el sistema BvgAS, los cuales se expresan durante la fase virulenta de la bacteria, y por la expresión de genes de avirulencia (*vrgs*), los cuales se encuentran reprimidos en la fase virulenta de la bacteria. Los genes que se expresan durante la fase virulenta de la bacteria han sido muy estudiados, así como su participación en la patogénesis de *Bordetella* spp. Sin embargo, hasta la fecha se conocen pocos genes de avirulencia y el estudio sobre éstos ha sido escaso. En *B. bronchiseptica* se han identificado como *vrgs* a los genes del flagelo, de la ureasa y a las proteínas

del sistema Lap mientras en *B. pertussis* a los 5 *vrgs* descriptos (*vrg-6*, *vrg-18*, *vrg-24*, *vrg-53* y *vrg-73*).

En este trabajo de Tesis se llevó a cabo un estudio transcriptómico por RNA-seq de una cepa de *B. bronchiseptica* mutante en *bvgR* y una cepa *wild type*, en condiciones de virulencia ya que es la fase en la que se expresa BvgR. Según los parámetros elegidos para el análisis 319 genes se encontraron diferencialmente expresados entre las cepas, la mayoría de ellos sobreexpresados en la mutante *BbbvgR*.

Un 20% de los genes con mayor expresión en *BbbvgR* correspondieron a genes pertenecientes a los operones flagelares. Esto indica que BvgR reprime la acción del flagelo actuando sobre el primer escalón en la síntesis del flagelo, es decir, sobre los reguladores maestros FlhD y FlhC. Por lo tanto, de acuerdo a los resultados del capítulo anterior y del actual, es más probable que BvgR regule la movilidad a nivel de expresión de genes y no mediante interacción con FlhD, como es el caso de YdiV de *E. coli* y de otras proteínas con dominio EAL sin actividad catalítica.

Por otro lado, un 5% de los genes sobreexpresados en *BbbvgR* correspondieron a proteínas del metabolismo de c-di-GMP lo cual implicaría que BvgR actúa como un conector entre los sistemas de regulación compuestos por el sistema de dos componentes BvgAS y por el segundo mensajero c-di-GMP. En una primera instancia puede parecer contradictorio el hecho de que tanto diguanilato ciclasas como fosfodiesterasas estén sobreexpresadas en el mutante *BbbvgR* ya que es probable que el nivel global de c-di-GMP no aumente ni disminuya notablemente. No obstante, el concepto actual de la regulación mediada por el c-di-GMP es que las proteínas responden a niveles locales de c-di-GMP; este es el caso de LapD y GcbC de *P. fluorescens*, las cuales deben interactuar físicamente para que GcbC sintetice c-di-GMP, LapD lo una y así, promuevan la formación de biofilm (Giacalone *et al.*, 2018). Por lo tanto, las diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas que se encuentran sobreexpresadas en el mutante *BbbvgR* pueden cumplir su función y afectar únicamente a las proteínas que se ubican espacialmente cerca de ellas. Además, los cambios en los niveles de c-di-GMP dados por estas enzimas podrán afectar distintos fenotipos en función de proteínas efectoras, cuya expresión puede depender de otros factores. Por ejemplo, en *S. typhimurium* el c-di-GMP regula tanto la movilidad como la síntesis de celulosa de manera independiente, uniéndose a dos proteínas con dominio PilZ distintas: YcgR, que inhibe la rotación del flagelo y BcsA, que deja de inhibir alostéricamente a la celulosa sintasa BscB (Paul *et al.*, 2010; Morgan, McNamara and Zimmer, 2014). Por otro lado, el 47% de los genes con expresión disminuída en el mutante *BbbvgR* también se encuentran reprimidos

en una situación de alta concentración intracelular de c-di-GMP en *B. bronchiseptica*. Este resultado nos hace preguntarnos si diferencias en los niveles de c-di-GMP podrían inhibir el mecanismo por el cual BvgR estimula la expresión de aquellos genes menos expresados en *BbbvgR*⁻. Una hipótesis es que BvgR una c-di-GMP y en función de eso, cambie el patrón de interacción con proteínas que regulan la expresión de los genes en cuestión.

El 15% de los genes con expresión disminuida en el mutante *BbbvgR* forman parte del locus *bsc* del SST3 de *B. bronchiseptica*. Considerando que históricamente BvgR fue clasificada como una proteína represora de genes de avirulencia exclusivamente, la identificación de genes de virulencia regulados positivamente por BvgR resultó un hecho muy interesante y novedoso. Este aspecto continuó estudiándose más adelante en esta Tesis (Capítulo 5). La regulación de la actividad del SST3 de *Bordetella* es muy compleja e intervienen múltiples componentes como lo son el sistema BvgAS, el sistema BtrAS y la chaperona Hfq. De hecho, la expresión de *hfq* está aumentada en el mutante *BbbvgR*⁻ en comparación a la cepa *wild type* y forma parte del grupo de chaperonas reguladas por BvgR. Hfq cumple un rol clave en el control post-transcripcional de la expresión génica en bacterias Gram negativas, incluyendo a las del género *Bordetella*, afectando tanto su metabolismo como su patogénesis (Bibova *et al.*, 2013, 2015; Feliciano *et al.*, 2016; Alvarez Hayes *et al.*, 2020).

Por otro lado, cerca de un 10% del total de los genes diferencialmente expresados entre las cepas estudiadas están anotados como reguladores transcripcionales y chaperonas, entre los cuales se destacan *hfq*, *flhD*, *flhC*, *fliA*, *rpoZ*, *dnaJ*, *dnaK*, *htpG*, *bcrH1* y *bcrH2*, lo cual sugiere que BvgR podría regular gran parte de su regulón de una manera indirecta, a través de alguna de estas proteínas. No obstante, discrepancias en los sentidos en los que estas chaperonas y BvgR regulan la expresión de algunas proteínas indican que son procesos de regulación complejos y que actúan en múltiples niveles.

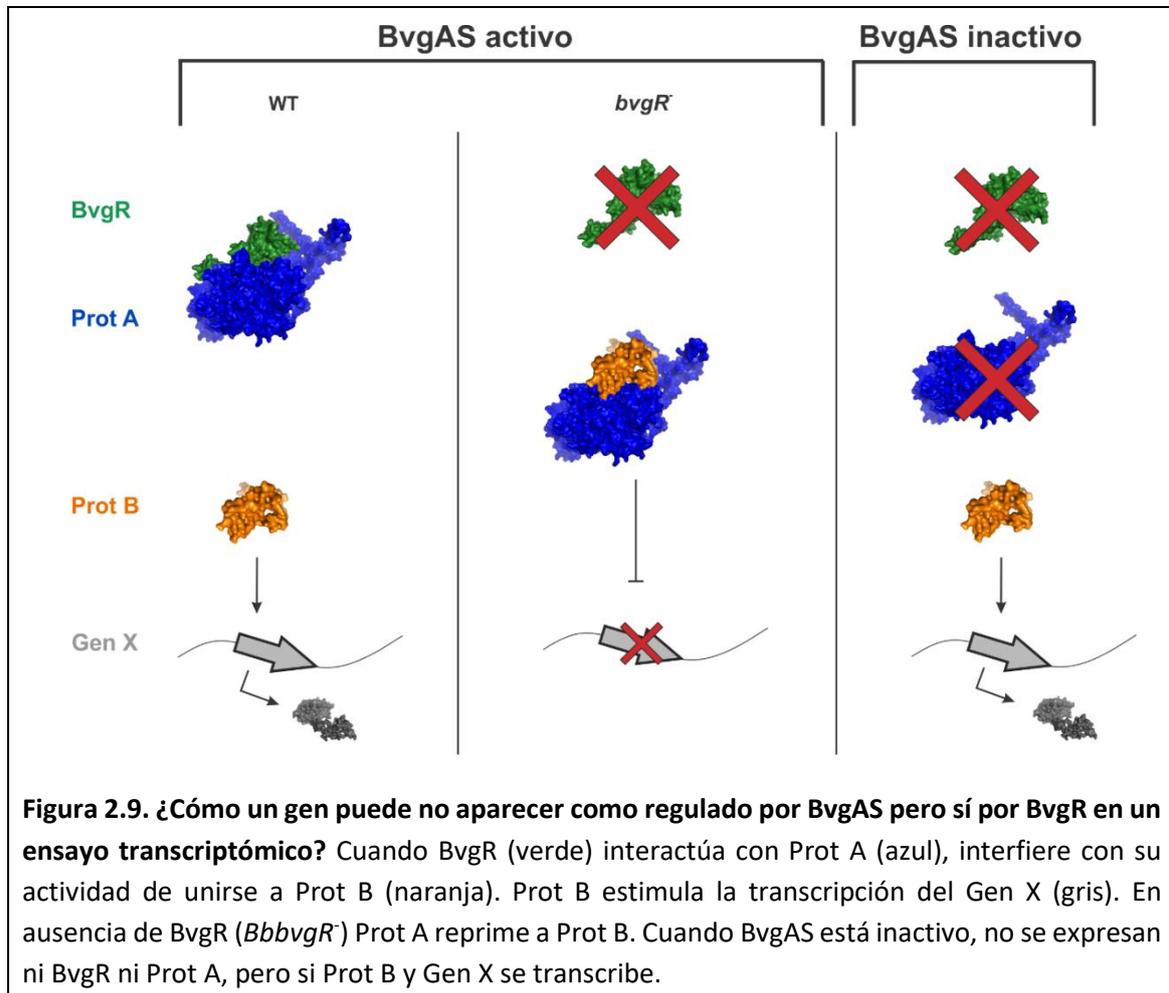
En la comparación también se encontraron niveles de expresión distintos entre las cepas de algunos genes que codifican para adhesinas como BipA, las fimbrias Fim2 y Fim3 y la adhesina BrtA, lo cual sugeriría un rol de BvgR en la regulación de fenotipos de adhesión y formación de biofilm. Estos resultados coinciden parcialmente con el trabajo transcriptómico de Nicholson *et al.*, en el que se reportó que el flagelo es un factor importante durante las primeras etapas de la formación de biofilm de *B. bronchiseptica*. En el primer trabajo publicado sobre BipA de *B. bronchiseptica*, en el que se la identificó y caracterizó, los autores reportaron que esta proteína no era requerida para la colonización del tracto respiratorio de conejos (Stockbauer *et al.*, 2001). Luego, el laboratorio del Dr. Deora planteó que BipA podía ser una adhesina importante para el

establecimiento de la infección pero que su rol no podía apreciarse en el mutante *bipA* porque otras adhesinas compensaban su ausencia. De hecho, un doble mutante en *bipA* y en *bcfA*, otra adhesina de fase intermedia, resultó defectuoso en la colonización traqueal de ratas (Sukumar *et al.*, 2007). Estos resultados sugieren que BipA es una adhesina importante para el inicio de la infección.

Otro dato de interés es que el 18% del total de genes con expresión diferencial entre las cepas no están presente en *B. pertussis* y cerca del 3% no están presentes en *B. parapertussis*. Estos datos, así como la diferente regulación de los cuatro *vrgs* (*vrg-6*, *vrg-18*, *vrg-24* y *vrg-53*) y otras proteínas entre las clásicas *Bordetella*, dan muestra de las diferencias existentes entre dichas especies. Al analizar el tamaño de los genomas de las clásicas *Bordetella* se observa que la reducción en los genomas se asoció a la especialización del huésped. Las especies del género *Bordetella* evolucionaron y se adaptaron para infectar de manera específica determinados huéspedes. Como ha ocurrido en otros géneros los procesos de diversificación y especificación en *Bordetella* spp. fueron acompañados tanto por la ganancia como por la pérdida de genes, aunque la pérdida e inactivación de genes ha sido más importante (Linz *et al.*, 2019). Durante su especialización, *B. pertussis* y *B. parapertussis* (humana) redujeron su genoma cerca del 22 y 9% con respecto al de *B. bronchiseptica*, respectivamente. Esta reducción se produjo, en parte, debido a la abundancia de secuencias de inserción en el genoma de *Bordetella* spp., lo cual ha derivado en una reducción de su capacidad metabólica y en la adaptación de los diferentes mecanismos de regulación (Linz *et al.*, 2019).

Un 30% de los genes regulados por BvgR no se encuentran regulados por el sistema BvgAS, a pesar de que BvgR sea un gen regulado por este sistema. Una posible explicación para esta situación es que BvgR, de manera directa o indirecta, interfiera en un sistema de regulación con proteínas activadas por BvgAS para regular dichos genes. Esto concuerda con nuestra hipótesis de que BvgR interactúa con otra proteína para llevar adelante su función regulatoria. En la Figura 2.9 se esquematiza un ejemplo de esta situación: la proteína A (prot A) está activada por el sistema BvgAS y regula negativamente la actividad de la proteína B (independiente de BvgAS), que a su vez estimula la expresión del gen X. Cuando el sistema BvgAS está activo, BvgR interfiere con la actividad de la proteína A, ésta no inhibe a la proteína B y entonces el gen X se expresa. Si el sistema BvgAS está apagado, ni BvgR ni la proteína A se expresan y, por ende, la proteína B estimula la transcripción del gen X. Cuando BvgR no está presente (mutante *BbbvgR*), la proteína A regula negativamente a la proteína B y entonces el gen X no se expresa. De esta

manera, cuando el sistema BvgAS está apagado o prendido se expresa el gen X, pero no así cuando el sistema BvgAS está activado, pero BvgR no se expresa.



En conclusión, en este capítulo avanzamos en la caracterización de los genes regulados por BvgR a nivel transcripcional. En concordancia con el concepto de BvgR sostenido hasta la fecha observamos un fuerte rol represor, principalmente en lo que respecta a los genes del flagelo. No obstante, los resultados obtenidos nos permitieron ampliar este concepto e identificar otros grupos de genes que regula, y más aun, identificar genes relacionados con la virulencia cuya expresión se ve estimulada por BvgR. La presencia de genes asociados al metabolismo de c-di-GMP, así como la comparación con un análisis transcriptómico de *B. bronchiseptica* con altos niveles de c-di-GMP sugiere una conexión entre BvgR y el metabolismo de c-di-GMP. Considerando que BvgR regula la expresión de genes sin tener un dominio de unión a ADN, resultaría interesante analizar en futuros estudios si cumple un rol regulatorio a nivel de proteína.

CAPITULO 3

Relación de BvgR con la regulación
mediada por c-di-GMP: movilidad

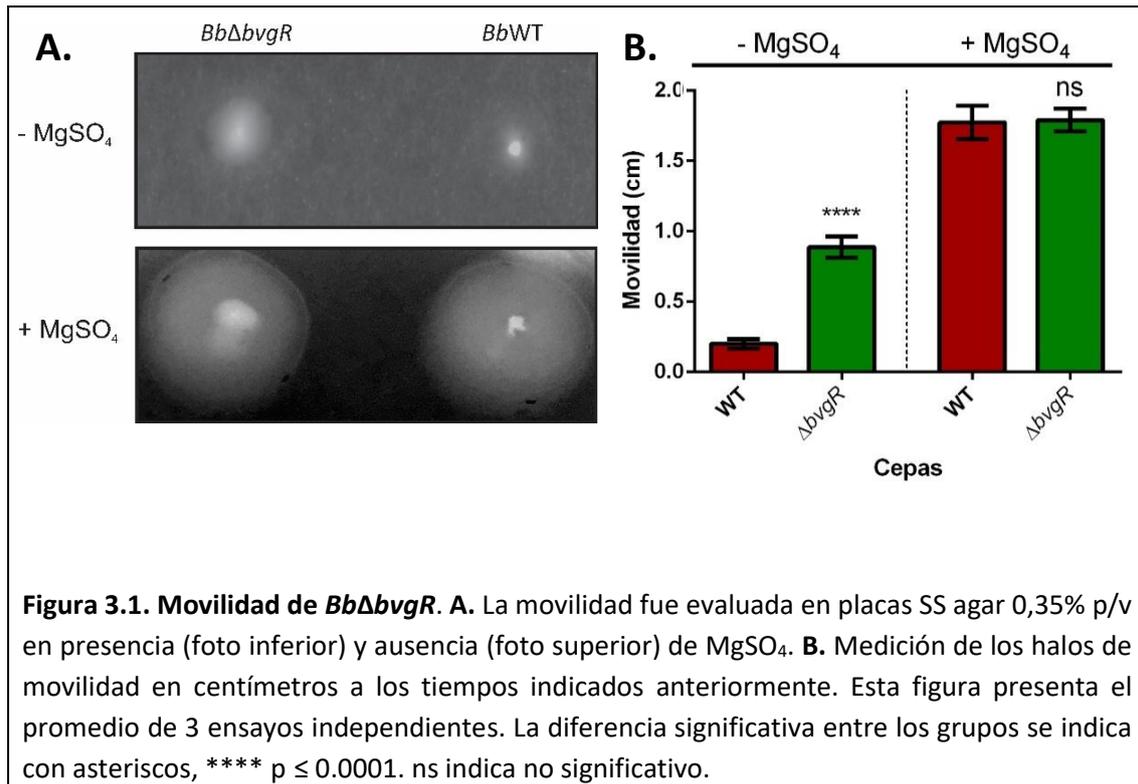
Introducción

Como ya se ha mencionado en la introducción y en capítulos anteriores, BvgR regula la movilidad de *B. bronchiseptica*. Nuestros estudios con una cepa mutante insercional en *bvgR* indican que la regulación ocurre a nivel transcripcional, comenzando por el regulador maestro *flhD*. En el presente capítulo evaluaremos la regulación de la flagelina, tanto a nivel de transcripto como de proteína, en una cepa mutante obtenida por delección limpia de *bvgR*. Luego, abordamos la hipótesis de que el fenómeno de movilidad podría estar regulado por el c-di-GMP, de manera indirecta por BvgR, a través de las fosfodiesterasas reguladas por BvgR e identificadas en el análisis transcriptómico.

1. Flagelina

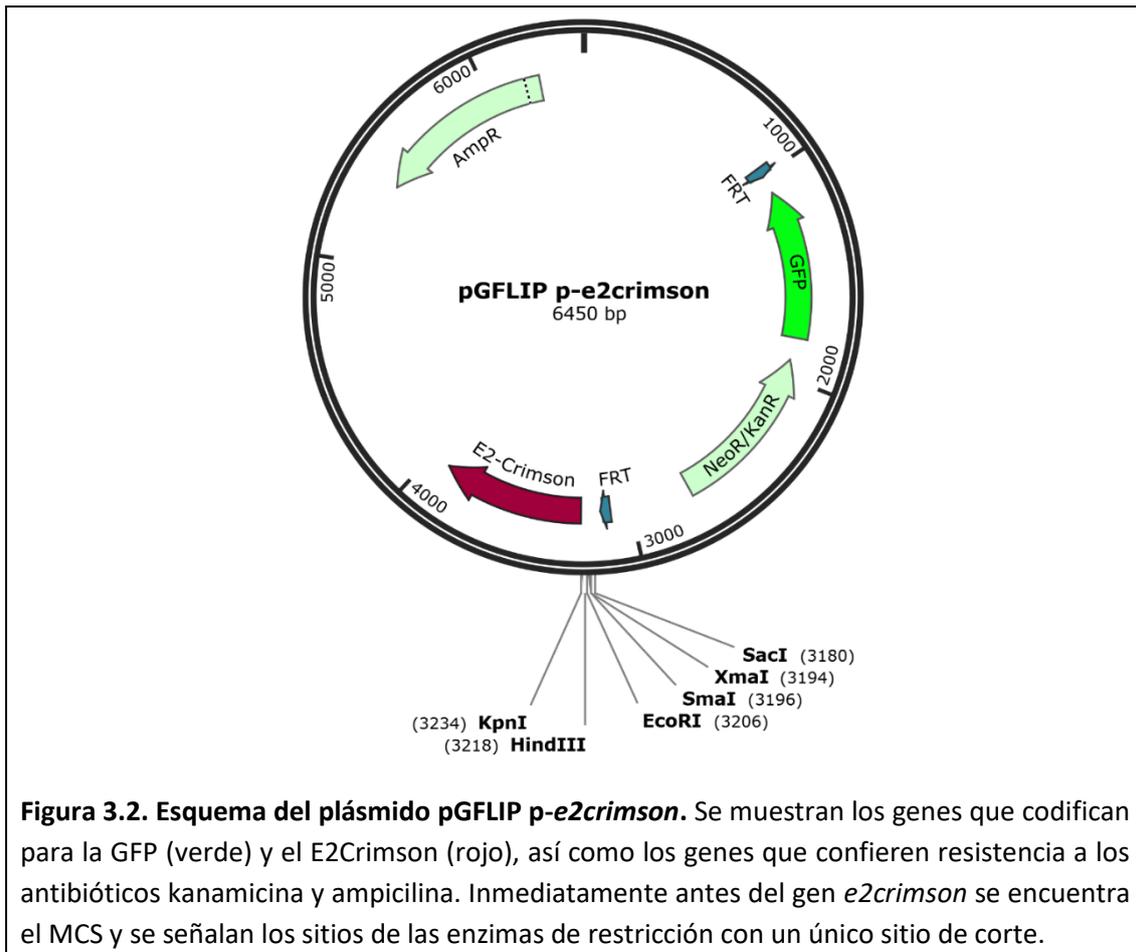
Anteriormente se mencionó que nuestro grupo determinó que una cepa de *B. bronchiseptica* con el gen *bvgR* interrumpido por un plásmido (*BbbvgR*) es capaz de nadar en agar blando en fase virulenta, a diferencia de lo que ocurre con la cepa *wild type* en esa condición (Fernández *et al.*, 2005). Considerando que las mutaciones por inserción pueden causar efectos polares y por ende, pueden interferir a la hora de interpretar los resultados de un ensayo, decidimos construir una cepa sin el gen *bvgR* y sin incorporar ADN foráneo (delección limpia). La construcción de dicha cepa, a la cual se la denominó *BbΔbvgR*, se llevó adelante con la técnica de doble recombinación homóloga *in vivo*, tal como se detalla en la sección Materiales y Métodos.

Luego de obtener la cepa *BbΔbvgR* se evaluó su capacidad de nadar en agar blando tanto en fase virulenta como avirulenta. El resultado obtenido concuerda con lo reportado anteriormente y se muestra en la Figura 3.1. Como era esperado, la cepa *BbWT* no presentó movilidad en fase virulenta y el diámetro medido en el ensayo corresponde al crecimiento bacteriano. La movilidad de *BbΔbvgR* en fase virulenta resultó significativamente mayor que la de la cepa *BbWT*. En fase avirulenta (con el agregado de 40 mM de MgSO₄) la movilidad de las cepas analizadas resultó indistinguible.



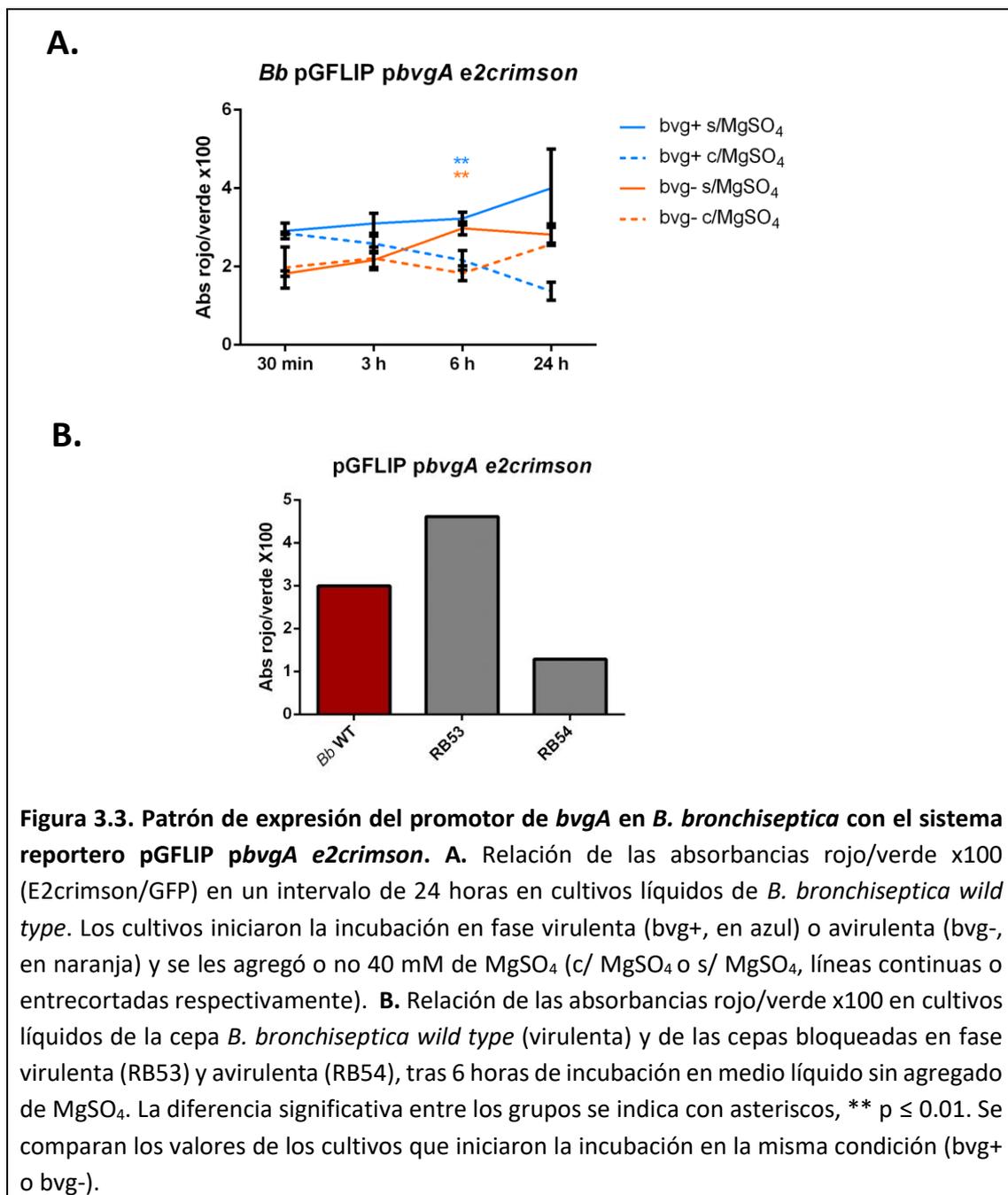
Para corroborar que *BbΔbvgr* es capaz de nadar en fase virulenta debido al flagelo tomamos dos enfoques: uno a nivel transcripcional y otro a nivel de producción de la proteína flagelina.

Para poner en práctica el primer enfoque hicimos un ensayo de fusión transcripcional entre el promotor de la flagelina y un plásmido reportero construido en este trabajo de Tesis. Este plásmido contiene dos genes que codifican para proteínas fluorescentes, uno bajo un promotor constitutivo y el otro bajo el promotor de interés. Para construir este vector se utilizó como base al plásmido pGFLIP que lleva al gen *gfp* bajo el promotor constitutivo Ps12 y que ha sido utilizado anteriormente en bacterias del género *Bordetella* (Byrd *et al.*, 2013; Ambrosis *et al.*, 2016). Con el objetivo de que el vector exprese dos proteínas fluorescentes se procedió a incorporar al plásmido el gen *e2crimson*, que codifica por una proteína roja fluorescente de rápida maduración, adyacente al sitio de clonado múltiple (MCS). De esta manera, el vector construido presenta al gen *gfp* bajo el control de un promotor constitutivo y al gen *e2crimson* bajo el control del promotor de interés clonado en el MCS (Figura 3.2). Este sistema reportero permite evaluar la actividad del promotor de interés, normalizándolo con la actividad del promotor constitutivo de manera independiente del crecimiento bacteriano.

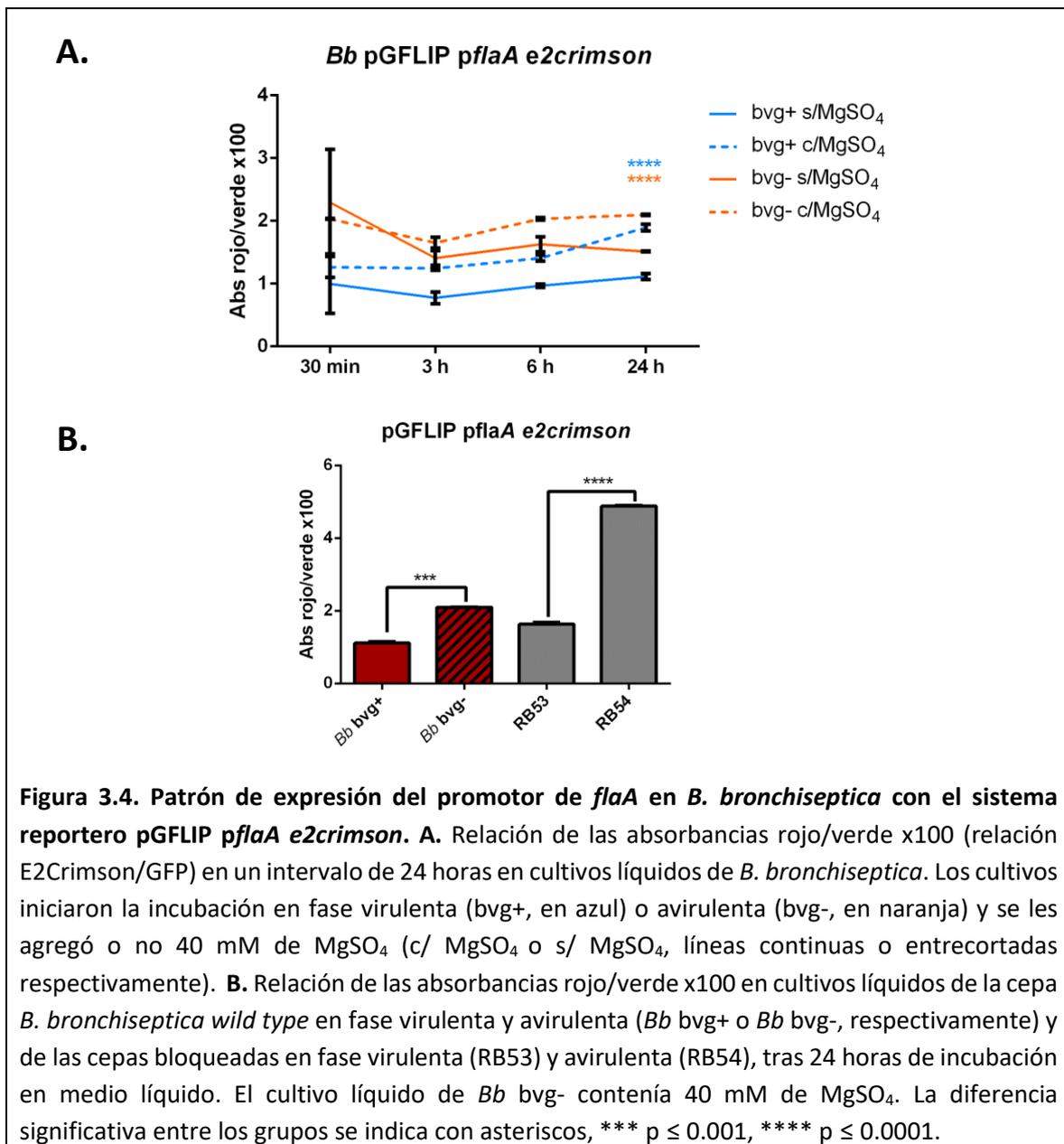


Con el objetivo de corroborar el funcionamiento del sistema reportero de pGFLIP p-*e2crimson* en *B. bronchiseptica* ensayamos el patrón de expresión de dos genes ya caracterizados, el gen de fase virulenta *bvgA* y el gen de fase avirulenta *flaA*. En primer lugar, se realizó un seguimiento de la fluorescencia durante un intervalo de 24 horas de la cepa *BbWT* bajo distintas condiciones. Se cuantificó la fluorescencia de cultivos que iniciaron la incubación en fase virulenta (*bvg+*) o en fase avirulenta (*bvg-*), a los que se les agregó o no $MgSO_4$. En el caso del promotor de *bvgA* aquellos cultivos suplementados con $MgSO_4$ (líneas entrecortadas) presentaron valores más bajos de la relación de las absorbancias rojo/verde (relación E2Crimson/GFP) que aquellos sin agente modulador (líneas continuas) (Figura 3.3, panel A). Esto coincide con el hecho de que *bvgA* es un gen de fase virulenta, y por lo tanto se reprime en presencia de $MgSO_4$. Tras 6 horas de incubación la diferencia entre los cultivos con y sin agregado de $MgSO_4$ fue estadísticamente significativa para ambas condiciones iniciales (*bvg+* o *bvg-*). Con este resultado establecimos a las 6 horas de incubación como tiempo de muestreo para próximos ensayos con este promotor.

En segunda instancia, se evaluó el vector con el promotor de *bvgA* en cepas bloqueadas en fase virulenta (*B. bronchiseptica* RB53), avirulenta (*B. bronchiseptica* RB54) y en la cepa *wild type* con la cual usualmente trabajamos (*B. bronchiseptica* 9.73H+), en ausencia de MgSO₄. El resultado del ensayo en las cepas bloqueadas en fase virulenta y avirulenta (RB53 y RB54 respectivamente) tras 6 horas de incubación coincidió con lo esperado ya que se obtuvieron valores más altos de la relación E2Crimson/GFP en la cepa bloqueada en fase virulenta que en la cepa bloqueada en fase avirulenta (Figura 3.3, panel B).

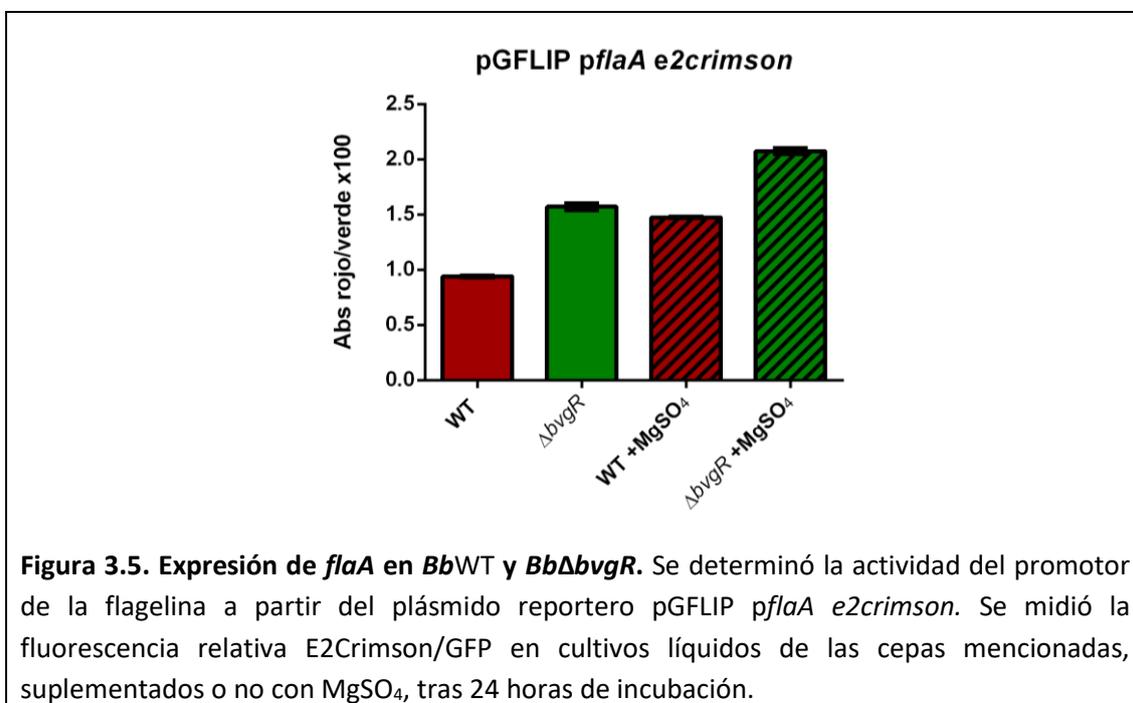


Con respecto a los ensayos con el promotor de la flagelina (*flaA*) el patrón de expresión fue el inverso. Al igual que en el caso anterior, inicialmente se realizó el seguimiento de la fluorescencia de la cepa *wild type* durante 24 horas en cultivos líquidos en las fases virulenta y avirulenta, con y sin el agregado de MgSO₄. Los valores de E2Crimson/GFP de los cultivos suplementados con MgSO₄ (líneas entrecortadas) fueron mayores que sus pares sin suplementar (líneas continuas) a las 3 horas de incubación, aunque dicha diferencia resultó estadísticamente significativa recién a las 24 horas de incubación (Figura 3.4, panel A). Por esta razón, se consideró a las 24 horas de incubación como tiempo de muestreo para futuros ensayos.

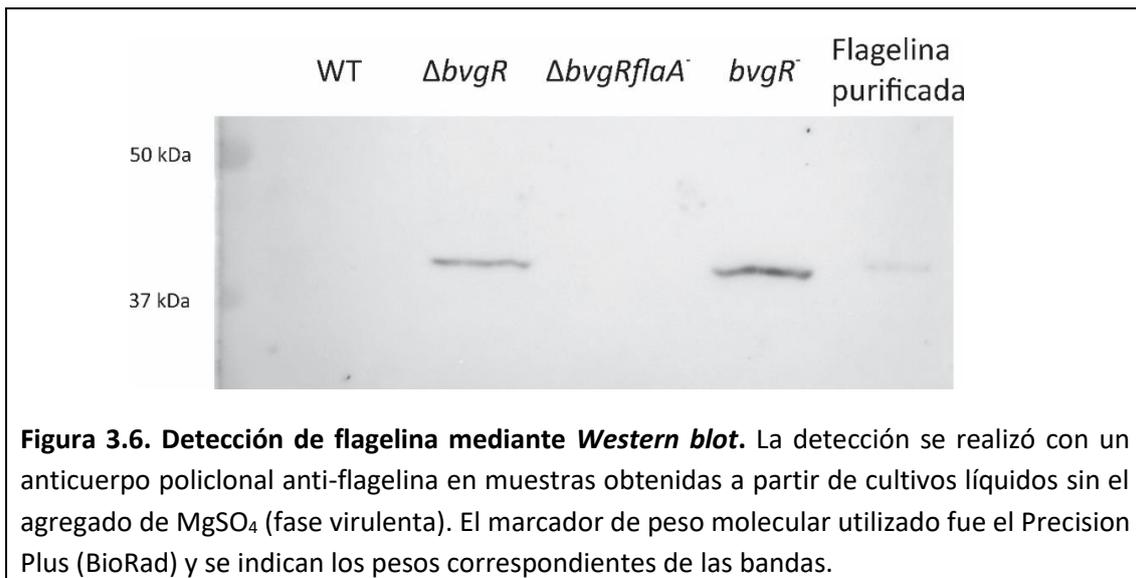


Cuando se llevó adelante el mismo ensayo con las cepas bloqueadas en fase virulenta (RB53) y en fase avirulenta (RB54), junto a la cepa *wild type* en presencia y ausencia de $MgSO_4$ (*bvg-* y *bvg+* respectivamente), se observó que la cepa bloqueada en fase avirulenta (RB54) presentó una relación E2Crimson/GFP mayor que la cepa bloqueada en fase virulenta (RB53). En el mismo sentido, la cepa *wild type* cultivada en presencia de $MgSO_4$ mostró valores más altos de E2Crimson/GFP que aquella cultivada sin el agregado del agente modulador. Ambos resultados eran de esperarse considerando que el flagelo se expresa en fase avirulenta (Figura 3.4, panel B).

Para evaluar la regulación en la expresión de la flagelina mediada por BvgR se transfirió el plásmido pGFLIP *pflaA e2crimson* mediante conjugación a la cepa *BbΔbvgR*. En la Figura 3.5 se grafica la relación E2Crimson/GFP obtenida a partir de cultivos líquidos de esta cepa en comparación con la cepa *wild type*. En la figura se observa que en el entorno *BbΔbvgR* la relación E2Crimson/GFP es mayor que en el entorno *BbWT* tanto en presencia (fase avirulenta) como en ausencia (fase virulenta) de $MgSO_4$. Dada la situación de emergencia sanitaria por la pandemia del virus SARS-CoV-2 no fue posible repetir este ensayo, razón por la cual la Figura 3.5 no presenta datos estadísticos.



Por otro lado, con el fin de confirmar que la regulación sobre el flagelo por parte de BvgR repercute a nivel de producción de proteína se realizaron ensayos de *Western blot* utilizando un suero policlonal capaz de detectar flagelina de *B. bronchiseptica*. Los ensayos de *Western blot* se realizaron sobre muestras de proteínas obtenidas a partir de cultivos líquidos en ausencia de moduladores de fase. Con las mismas muestras se realizó un ensayo de movilidad (Figura 3.7). Como era de esperarse, la muestra obtenida a partir de *BbWT* no presentó ninguna banda correspondiente a la flagelina (Figura 3.6, primera calle). Por el contrario, se obtuvo una banda en cada una de las muestras de *BbΔbvgR* y *BbbvgR⁻* que coincide en altura con la flagelina purificada de *B. bronchiseptica* utilizada como control positivo (Figura 3.6, segunda, cuarta y quinta calle, respectivamente). Como control negativo se utilizó la cepa *BbΔbvgRflaA⁻* que posee interrumpido el gen de *flaA* y por lo tanto no sintetiza flagelo, por lo cual carece de dicha banda (Figura 3.6, tercera calle). La cepa *BbΔbvgRflaA⁻* tampoco presenta movilidad en agar blando en fase avirulenta, como se muestra en la Figura 3.7.



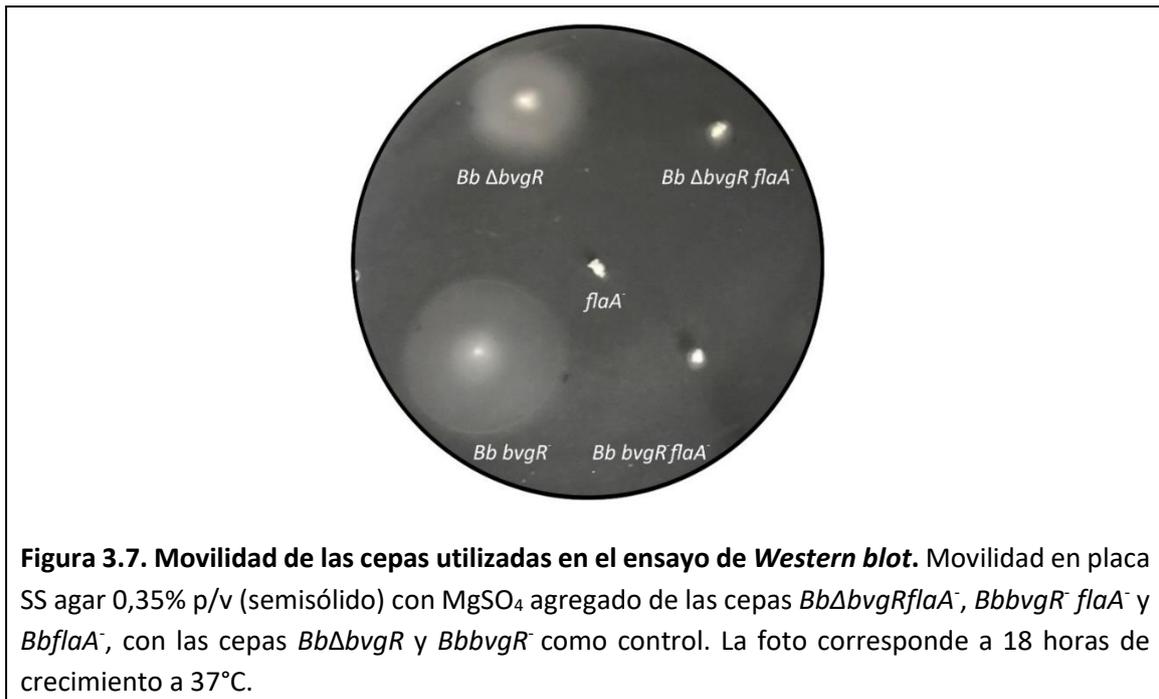


Figura 3.7. Movilidad de las cepas utilizadas en el ensayo de *Western blot*. Movilidad en placa SS agar 0,35% p/v (semisólido) con $MgSO_4$ agregado de las cepas *BbΔbvgRflaA*⁻, *BbbvgR*⁻ *flaA*⁻ y *BbflaA*⁻, con las cepas *BbΔbvgR* y *BbbvgR*⁻ como control. La foto corresponde a 18 horas de crecimiento a 37°C.

Los resultados expuestos en esta sección demuestran que el mutante *BbΔbvgR*, obtenido por doble recombinación, presenta expresión del gen *flaA* y síntesis de flagelina durante la fase virulenta de la bacteria, lo cual no sucede en el caso de la cepa *BbWT*. Estos resultados confirman que la capacidad de *BbΔbvgR* de nadar en agar blando cuando se incubaba en ausencia de moduladores se debe a la expresión del flagelo.

a. Fosfodiesterasas sobreexpresadas en el mutante *BbΔbvgR*

Como se ha mencionado a lo largo de este trabajo, el c-di-GMP juega un rol clave en la regulación del proceso de transición entre los estilos de vida planctónico motil y sésil. De esta manera, altos niveles intracelulares de c-di-GMP suelen asociarse a un estilo de vida sésil con una mayor formación de biofilm, mientras que niveles bajos de c-di-GMP a un aumento en la movilidad bacteriana.

En la sección anterior se detalló que el mutante *BbΔbvgR* es mótil en fase virulenta cuando la cepa *wild type* no lo es. Los resultados presentados en el primer capítulo de este trabajo dejaron en evidencia que BvgR no presenta los aminoácidos requeridos para la actividad fosfodiesterasa específica de c-di-GMP en su dominio EAL. Los ensayos de movilidad reforzaron estos resultados, dado que al deleccionar una fosfodiesterasa los niveles de c-di-GMP deberían aumentar y se podría esperar que la cepa presente una movilidad igual o menor que la cepa *wild*

type, pero no mayor. No obstante, aunque BvgR no tenga actividad fosfodiesterasa, el fenotipo de movilidad presentado por el mutante *BbΔbvgR* aún puede deberse a cambios en la concentración de c-di-GMP.

Como se describió en el capítulo 2, en el ensayo transcriptómico hallamos genes relacionados con el metabolismo de c-di-GMP con mayor expresión en la cepa *BbΔbvgR* que en la cepa *BbWT*. Dentro de esta categoría se destacan dos posibles fosfodiesterasas: *BB3128* (*fold change*: 1.65, *p-value*: 0.02) y *BB1564* (*fold change*: 4.71, *p-value*: 0.002). Este hecho resulta muy interesante ya que un aumento en la movilidad bacteriana, como ocurre al delecionar *bvgR*, podría estar relacionado con una disminución en los niveles de c-di-GMP, producto de una mayor actividad fosfodiesterasa.

De acuerdo a la base de datos UniProt, el gen *bb3128* codifica para una proteína con dominio EAL y con dos dominios transmembrana mientras que el gen *bb1564* codifica para una proteína con un dominio HD-GYP, un dominio transmembrana y una región con estructura *coiled coil*. De esta manera, ambas proteínas probablemente sean fosfodiesterasas ancladas a membrana.

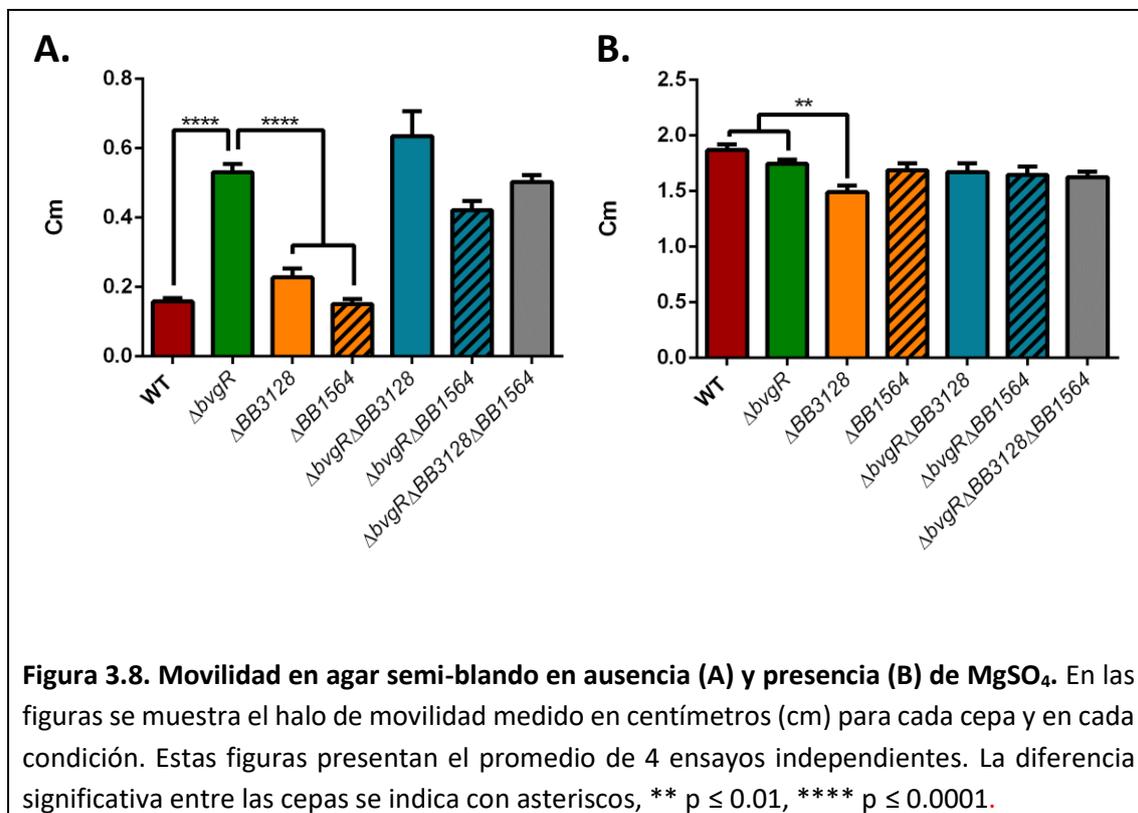
Una posible hipótesis es que en la cepa *wild type* BvgR reprime la movilidad de *B. bronchiseptica* debido a que disminuye la expresión de las posibles fosfodiesterasas *BB3128* y *BB1564*. En este sentido, BvgR al disminuir la expresión de ambas fosfodiesterasas, aumentaría los niveles de c-di-GMP y la bacteria permanecería inmóvil. Por el contrario, en ausencia de BvgR, ya sea en una cepa mutante o en la cepa *wild type* en fase avirulenta, ambas fosfodiesterasas se expresarían, disminuirían los niveles de c-di-GMP y la bacteria se movería. Es importante recordar que el c-di-GMP puede reprimir la movilidad aún en ausencia de BvgA (Sisti *et al.*, 2013; Belhart *et al.*, 2019).

Con el objetivo de determinar si el aumento de movilidad en el mutante *BbΔbvgR* se debe a la sobreexpresión de una de estas posibles fosfodiesterasas o bien, de ambas, se construyeron las mutantes delecionadas en ambos genes en la cepa *BbΔbvgR* y se evaluó la movilidad en agar blando de las cepas obtenidas.

Como se observa en la Figura 3.8, la cepa WT y las simple mutantes *BbΔBB3128* y *BbΔBB1564* no se movieron en fase avirulenta. Este fenotipo concuerda con lo esperado ya que la ausencia de una fosfodiesterasa mantendría niveles altos de c-di-GMP en la célula, y por ende, no debería estimular la movilidad de la cepa. Por el contrario, las cepas doble mutantes

(*BbΔbvgR ΔBB3128* y *BbΔbvgR ΔBB1564*) se movieron como el simple mutante *BbΔbvgR* bajo esas condiciones.

Dado que las enzimas fosfodiesterasas podrían reemplazarse entre sí, puede ocurrir que al eliminar una fosfodiesterasa de una cepa bacteriana no se observe un fenotipo determinado que sí regula ya que otra fosfodiesterasa compensa su ausencia. Para evaluar si esta situación ocurría con las doble mutantes obtenidas, decidimos construir una cepa que carezca tanto de *bvgR* como de ambas fosfodiesterasas (*BbΔbvgR ΔBB3128 ΔBB1564*). La cepa triple mutante bajo condiciones de virulencia no presentó diferencias significativas con la movilidad del mutante *BbΔbvgR* ni con los doble mutantes (Figura 3.8.).



Por otro lado, cuando se analizó la movilidad de las cepas en condiciones de avirulencia se observó que el mutante *BbΔBB3128* presentó una disminución en el halo medido en comparación con la cepa *BbWT* y con el resto de las cepas. Sin embargo, esta disminución no se observó en el doble mutante *BbΔbvgR ΔBB3128*.

Los resultados obtenidos indican que las proteínas BB3128 y BB1564 no son responsables del aumento de la movilidad que presenta la cepa *BbΔbvgR*.

Conclusiones

A lo largo de este capítulo corroboramos la regulación de BvgR sobre el flagelo en *B. bronchiseptica* e intentamos relacionar dicha regulación con la actividad de dos fosfodiesterasas reguladas por BvgR. Los ensayos realizados en este capítulo se llevaron adelante con una cepa mutante en *bvgR* obtenida por deleción limpia del gen, por lo que pudimos descartar posibles efectos polares existentes en el mutante insercional con el que se trabajó al comienzo de la Tesis.

La nueva cepa, *BbΔbvgR*, exhibió el mismo patrón de movilidad que la cepa *BbbvgR*. Además, presentó una mayor actividad del promotor de la flagelina respecto a la cepa *wild type*, tanto en fase virulenta como avirulenta, y sintetiza el flagelo durante la fase virulenta. Los ensayos de movilidad con una cepa de *BbΔbvgR* con el gen de la flagelina interrumpido demostraron que la movilidad de la cepa *BbΔbvgR* depende del flagelo y no de otros apéndices.

Cabe destacar que para determinar la actividad del promotor de la flagelina se construyó un plásmido reportero con dos proteínas fluorescentes compatible con *B. bronchiseptica* (pGFLIP p- *e2crimson*). Como parte de la puesta a punto de este sistema reportero el plásmido fue utilizado en ensayos con distintas cepas y bajo distintas condiciones para comprobar su funcionamiento y para elegir los tiempos de muestreo para los futuros ensayos. El uso de este nuevo sistema reportero nos permitió determinar que la actividad del promotor de la flagelina es mayor en la cepa *BbΔbvgR* que en la cepa *wild type* tanto en fase virulenta como avirulenta. No obstante, resulta interesante que la cepa *BbΔbvgR* no presenta mayor movilidad que la cepa *wild type* durante la fase avirulenta. Por último, se comprobó la producción de flagelina por parte de *BbΔbvgR* en fase virulenta.

Luego de comprobar que la regulación de BvgR afecta la síntesis del flagelo, nos planteamos la hipótesis de que dicha regulación podía ser producto de un cambio en los niveles de c-di-GMP intracelulares, de manera global o local. Como resultado del análisis transcriptómico presentado en el capítulo 2, observamos que BvgR regula la represión de varios genes relacionados con el metabolismo del c-di-GMP en *B. bronchiseptica*: dos posibles fosfodiesterasas (BB3128 y BB1564), dos posibles diguanilato ciclasas (BB2790 y BB3114) y una proteína dual con dominios EAL y GGDEF (BB2109).

En la segunda parte de este capítulo nos enfocamos en analizar el rol de las posibles fosfodiesterasas en la regulación de la movilidad mediada por BvgR. El razonamiento tras esta elección es que el aumento de la movilidad está generalmente asociado a bajos niveles de c-di-

GMP y que el mutante *BbΔbvgR* presenta una sobreexpresión de dos fosfodiesterasas respecto a la cepa *wild type*, por lo cual estas fosfodiesterasas podrían ser las responsables del fenotipo de movilidad aumentada. Los ensayos de movilidad realizados con las mutantes *BbΔbvgR ΔBB3128*, *BbΔbvgR ΔBB156* y *BbΔbvgR ΔBB3128 ΔBB156* sugieren que la represión del fenotipo de movilidad en fase virulenta mediado por BvgR no depende de las fosfodiesterasas BB3128 y BB1564. No obstante, resulta interesante que la delección de *BB3128* produce una ligera pero significativa disminución en la movilidad en fase avirulenta respecto a la cepa WT y del mutante *BbΔbvgR*. Este resultado sugiere que BB3128 podría estar implicada en la regulación de la movilidad durante la fase avirulenta de la bacteria, aunque no podemos especificar si a nivel transcripcional, traduccional o bien, regulando la actividad del aparato flagelar.

Tras haber evaluado el rol de las fosfodiesterasas reguladas por BvgR, nos quedó pendiente estudiar la posible implicancia de las diguanilato ciclasas BB2790, BB3114 y de la proteína dual BB2109 en el fenotipo de movilidad. *A priori* no esperamos que la sobreexpresión de las diguanilato ciclasas tengan relación con el aumento de movilidad en el mutante *BbΔbvgR*, pero considerando lo compleja que es la red regulatoria de c-di-GMP habría que evaluarlo de todas maneras. Sin embargo, creemos que la sobreexpresión de las diguanilato ciclasas en el mutante podría estar relacionada con otros fenotipos como la formación de biofilm y la citotoxicidad. Por otro lado, nuestro grupo de trabajo ya ha demostrado que la proteína BB2109 es necesaria para que la diguanilato ciclasa BdcA sintetice c-di-GMP y regule así la movilidad y la formación de biofilm. En este caso, descifrar cómo se relaciona la represión de BvgR sobre BB2109 con la interacción entre BB2109 y BdcA y la regulación de los distintos fenotipos podría ser un enfoque muy interesante, pero escapa a los objetivos de esta Tesis.

CAPITULO 4

Relación de BvgR con la regulación
mediada por c-di-GMP: formación de
biofilm

Introducción

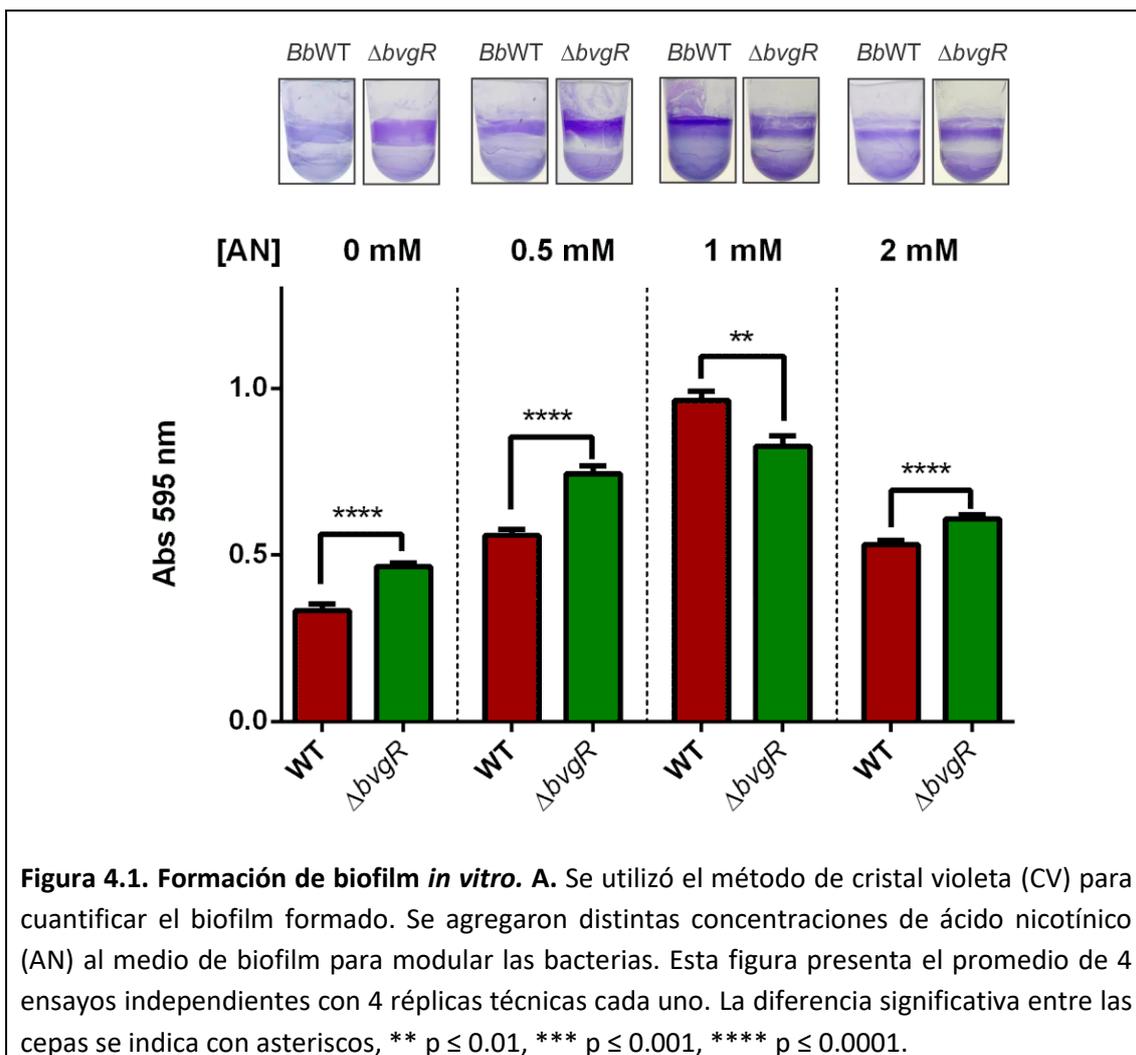
Como se ha mencionado en la introducción de este trabajo, las clásicas *Bordetellas* son capaces de adoptar un estilo de vida sésil y establecerse sobre superficies bióticas y abióticas formando biofilms (Mishra et al., 2005; Conover et al., 2010; Serra et al., 2011). La formación de biofilm por parte de *Bordetella* está regulada por varios factores, entre los que se incluyen el sistema de dos componentes BvgAS y el segundo mensajero c-di-GMP (Yasuhiko Irie, Mattoo and Ming H Yuk, 2004; Mishra et al., 2005; Sisti et al., 2013). Se ha descrito que FHA y las fimbrias contribuyen positivamente a la formación de biofilm en *B. bronchiseptica* mediando la adhesión entre bacterias y el sustrato, mientras que ACT inhibe la formación de biofilm al interactuar físicamente con FHA en la superficie de la bacteria (Yasuhiko Irie, Mattoo and Ming H Yuk, 2004; Hoffman et al., 2017). La adhesina BrtA también está involucrada en la formación de biofilm de *B. bronchiseptica*, principalmente en las fases intermedia y avirulenta de la bacteria, y se reportó que la expresión de *brtA* se ve aumentada en un mutante $\Delta bvgR$ (Ambrosis et al., 2016; Nishikawa et al., 2016). Además, Nicholson y colaboradores determinaron a partir de un estudio transcriptómico que la expresión del flagelo es requerida para una adecuada adhesión en los primeros estadios del biofilm mientras que su represión es absolutamente necesaria para la maduración del biofilm. (Tracy L. Nicholson, Conover and Deora, 2012).

Varios de los resultados hasta acá descritos nos han llevado a preguntarnos si BvgR cumple un rol en la regulación de la formación de biofilm. En primer lugar, porque BvgR forma parte del sistema de regulación de BvgAS que regula la represión de ciertos factores de fase avirulenta tras las primeras horas del proceso de formación de biofilm y también porque podría participar en el sistema de regulación mediado por c-di-GMP. Además, algunas proteínas que participan en la formación de biofilm, como el flagelo y la adhesina BrtA, son regulados por BvgR.

1. Formación de biofilm *in vitro*

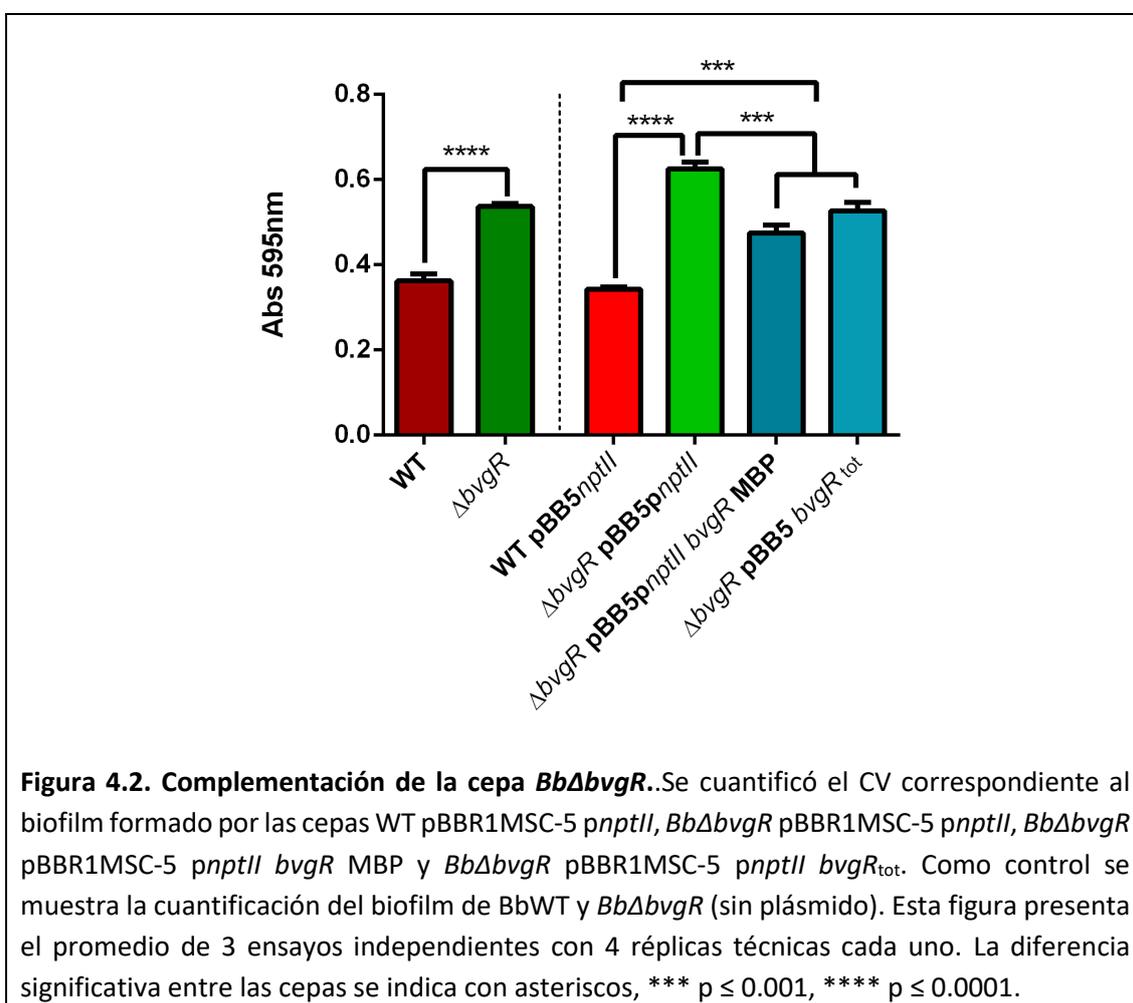
Para comenzar con este análisis se llevaron adelante ensayos de biofilm en placas multipocillo de PVC, en los que se determinó el biofilm formado tras 24 horas de incubación mediante la técnica de cristal violeta. En estos ensayos se comparó la capacidad de formar biofilm de la cepa *BbWT* y de *Bb Δ bvgR*, utilizando como medio de cultivo SS líquido suplementado con distintas concentraciones de ácido nicotínico, que actúa como agente modulador de fase de *Bordetella*. En la Figura 4.1 se presentan los resultados de estos ensayos.

Cabe destacar que el perfil de biofilm formado por la cepa *wild type* en las distintas concentraciones analizadas coincide con el descrito en bibliografía (Sisti *et al.*, 2013). En la figura se puede ver un aumento en la formación de biofilm por parte de la cepa *BbΔbvgR* respecto a la cepa *BbWT* bajo las concentraciones de 0, 0,5, 1 y 2,0 mM de ácido nicotínico. El mutante *BbΔbvgR* presentó un incremento del 39% en el biofilm formado en la condición de 0 mM, del 32% en la condición de 0,5 mM y del 14% en la condición de 2,0 mM de ácido nicotínico. Por el contrario, cuando se comparan los niveles de absorbancia medidos en la condición de 1 mM de ácido nicotínico se observa que la cepa *BbΔbvgR* presentó una disminución del 14% respecto a la cepa *BbWT*. La condición en la que el mutante *BbΔbvgR* presentó el mayor aumento relativo en la formación de biofilm respecto a la cepa *wild type* corresponde a la fase virulenta de *B. bronchiseptica* (sin adición de ácido nicotínico) y concuerda con la fase en la que más se expresa BvgR.

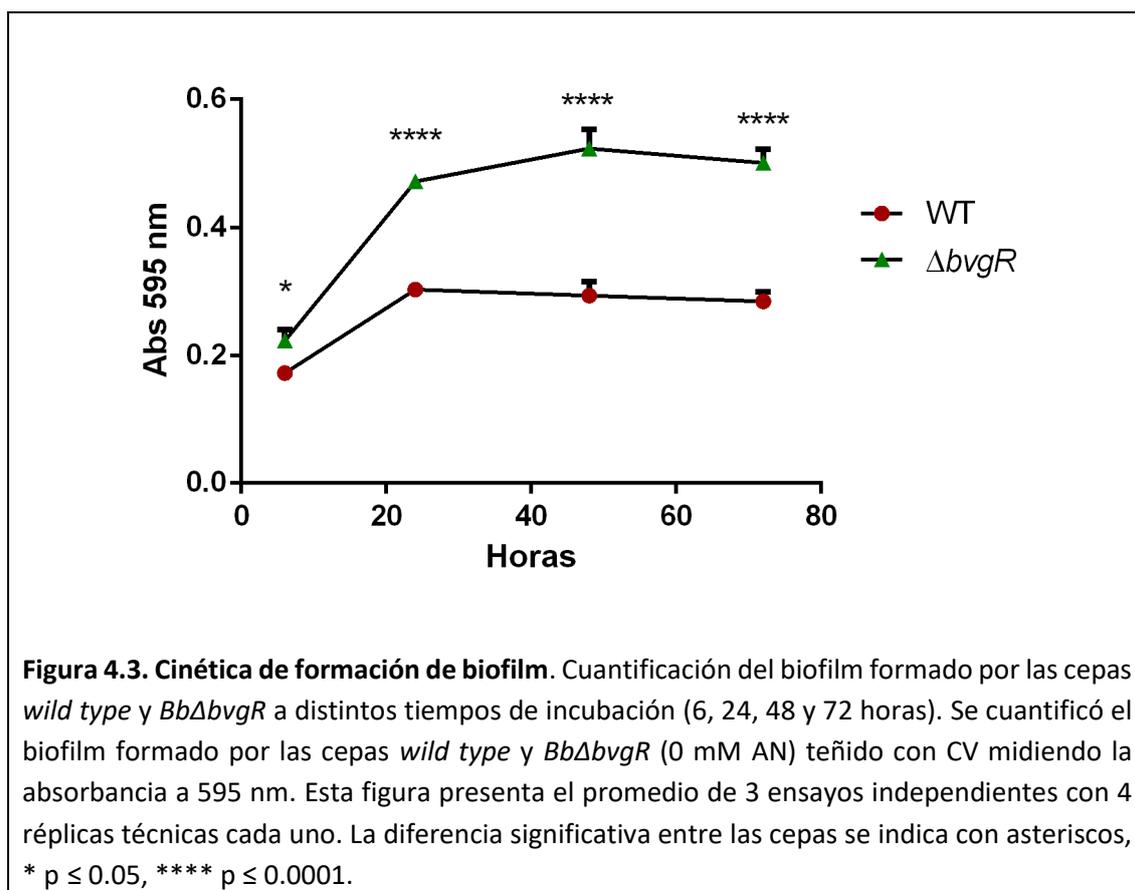


Considerando que la condición en la que *bvgR* exhibe su mayor expresión en *B. bronchiseptica* es en ausencia de ácido nicotínico (0 mM), ésta fue elegida como condición estándar para los siguientes ensayos.

Para corroborar la implicancia de *BvgR* en la formación de biofilm se llevaron adelante ensayos de formación de biofilm con la cepa *BbΔbvgR* complementada. Para ello se sobreexpresó a *bvgR* desde un plásmido bajo su propio promotor y bajo un promotor fuerte y fusionada a MBP. En la Figura 4.2 se muestra que ambas construcciones disminuyeron la cantidad de biofilm formado por la cepa *BbΔbvgR* (Figura 4.2).



Además, con el objetivo de tener un mejor panorama de la situación se llevó adelante un ensayo de cinética de formación de biofilm que consistió en determinar la cantidad de biofilm formado por las cepas wild type y *BbΔbvgR* tras 6, 24, 48 y 72 horas de incubación (Figura 4.3).



El resultado de este ensayo muestra que el incremento en el biofilm formado por la cepa *BbΔbvgR* respecto de la WT se observa desde los primeros estadios de este proceso. Transcurridas las primeras 6 horas de incubación la cepa *BbΔbvgR* forma más biofilm que la cepa WT de manera estadísticamente significativa y esta diferencia se acentúa en los tiempos siguientes. Cabe destacar que la pendiente entre los datos graficados a las 6 y 24 horas correspondiente a la curva de *BbΔbvgR* es mayor que la pendiente entre los datos correspondientes a la cepa WT en dichos tiempos. Una mayor pendiente indica una mayor velocidad de formación de biofilm por parte de la cepa *BbΔbvgR* durante el periodo de tiempo de 6 a 24 horas de incubación. Las diferencias entre las pendientes correspondientes a los siguientes intervalos de tiempo no son tan marcadas, lo cual indica que la cinética de formación de biofilm tras 24 horas de incubación y hasta las 72 horas es similar entre ambas cepas. Durante el intervalo de 72 horas analizado no se observó el proceso de desarmado de biofilm y, por ende, no pudimos evaluar si las cepas presentaban diferencias en esta etapa del proceso.

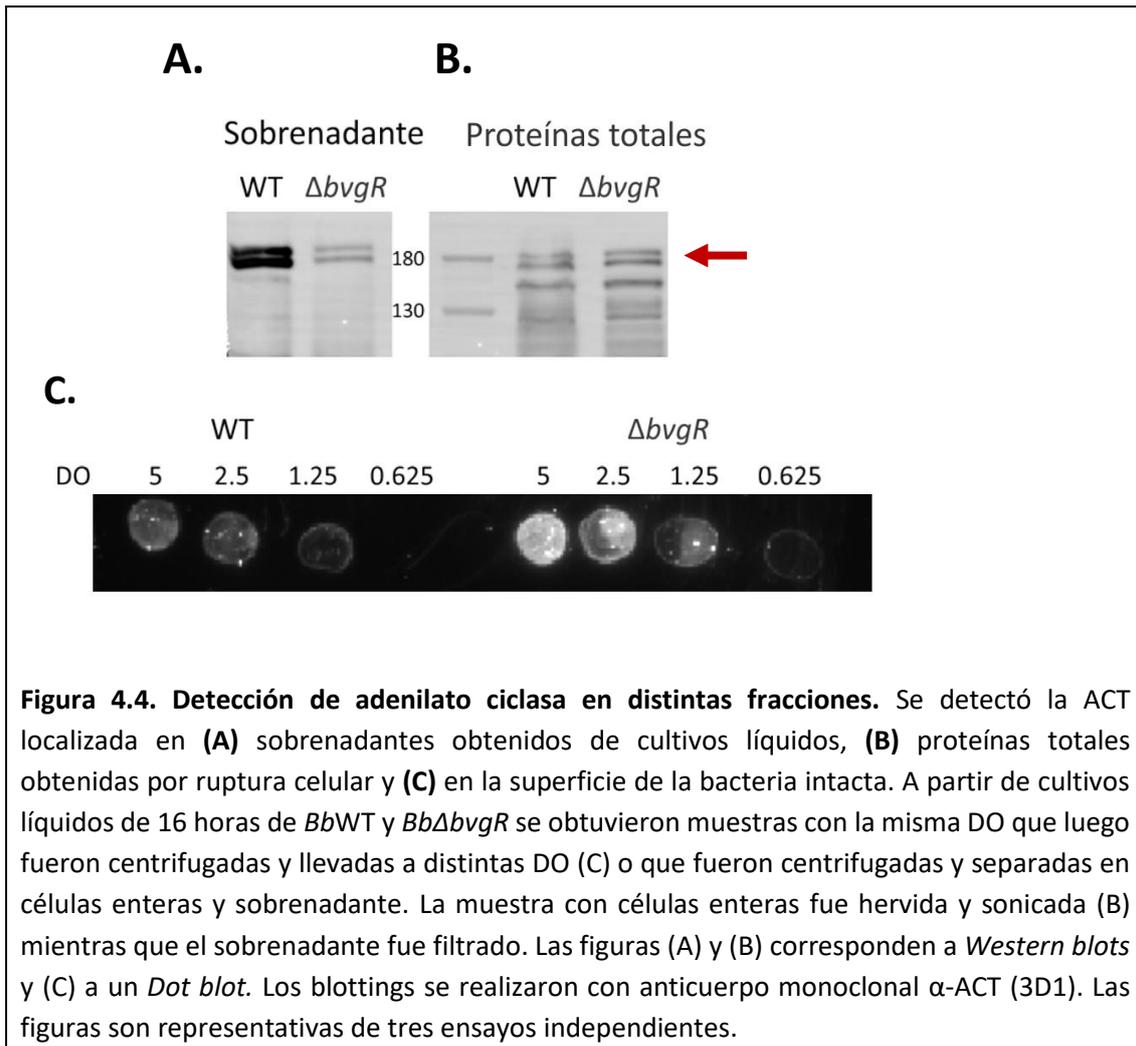
Con el objetivo de caracterizar aquellos factores presentes en el mutante *BbΔbvgR* que incrementan su capacidad de formar biofilm respecto a la cepa *wild type* decidimos evaluar dos

componentes bacterianos conocidos por estar involucrados en el proceso de formación de biofilm: ACT y el flagelo. La regulación por parte de BvgR sobre el flagelo ya se ha descrito a lo largo de este trabajo de Tesis y resulta evidente la necesidad de indagar el vínculo entre BvgR, el flagelo y el biofilm. Por su parte, la conexión entre BvgR y ACT es más compleja y por ello se explicará a continuación.

2. Participación de la ACT

Tal como se describió en la introducción, FHA y ACT están involucradas en la formación de biofilm de *Bordetella*. Resultados obtenidos en ensayos de infección en ratones con las cepas *BbWT* y *BbΔbvgR* (que serán descritos en el capítulo 7 de este trabajo de Tesis), nos sugirieron que la cepa *BbΔbvgR* podía presentar bajos niveles de ACT. Los resultados de la RNA-seq, presentados en el capítulo 1 no revelaron diferencias en la cantidad de transcritos de *cyoA* entre las muestras de *BbWT* y *BbΔbvgR*. No obstante, la bibliografía sobre ACT de *Bordetella* es extensa y se ha descrito que ACT está regulada por varios factores que actúan a nivel transcripcional, post-transcripcional y también sobre su secreción al medio extracelular (revisado en el review (Guiso, 2017)).

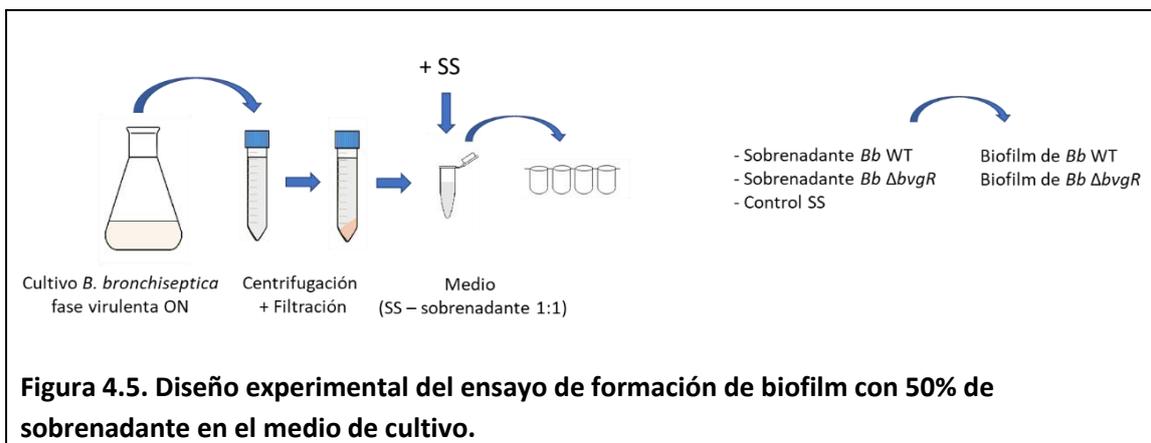
Para corroborar los niveles de la proteína ACT y su distribución en las cepas *BbWT* y *BbΔbvgR* analizamos muestras de proteínas obtenidas por ruptura celular o muestras obtenidas de sobrenadante de cultivo. Utilizamos la técnica de *Western blot*, enfrentando a las proteínas a un anticuerpo monoclonal 3D1 que detecta el dominio catalítico de ACT (Lee *et al.*, 1999). Como puede verse en la Figura 4.4 las muestras de proteínas totales de *BbΔbvgR* (calle 5) presentan una mayor cantidad de ACT, evidenciada como dos bandas del tamaño de 177 kDa señalizada con una flecha, que el mismo tipo de muestra de *BbWT* (calle 4) (Figura 4.4, panel B). Por el contrario, las muestras de sobrenadante de *BbΔbvgR* (calle 2) presentan bandas muchísimo más débiles que las de *BbWT* (calle 1) (Figura 4.4, panel A). Por lo tanto, estos resultados indican que *BbΔbvgR* secreta menor cantidad de ACT al sobrenadante que la cepa *BbWT*.



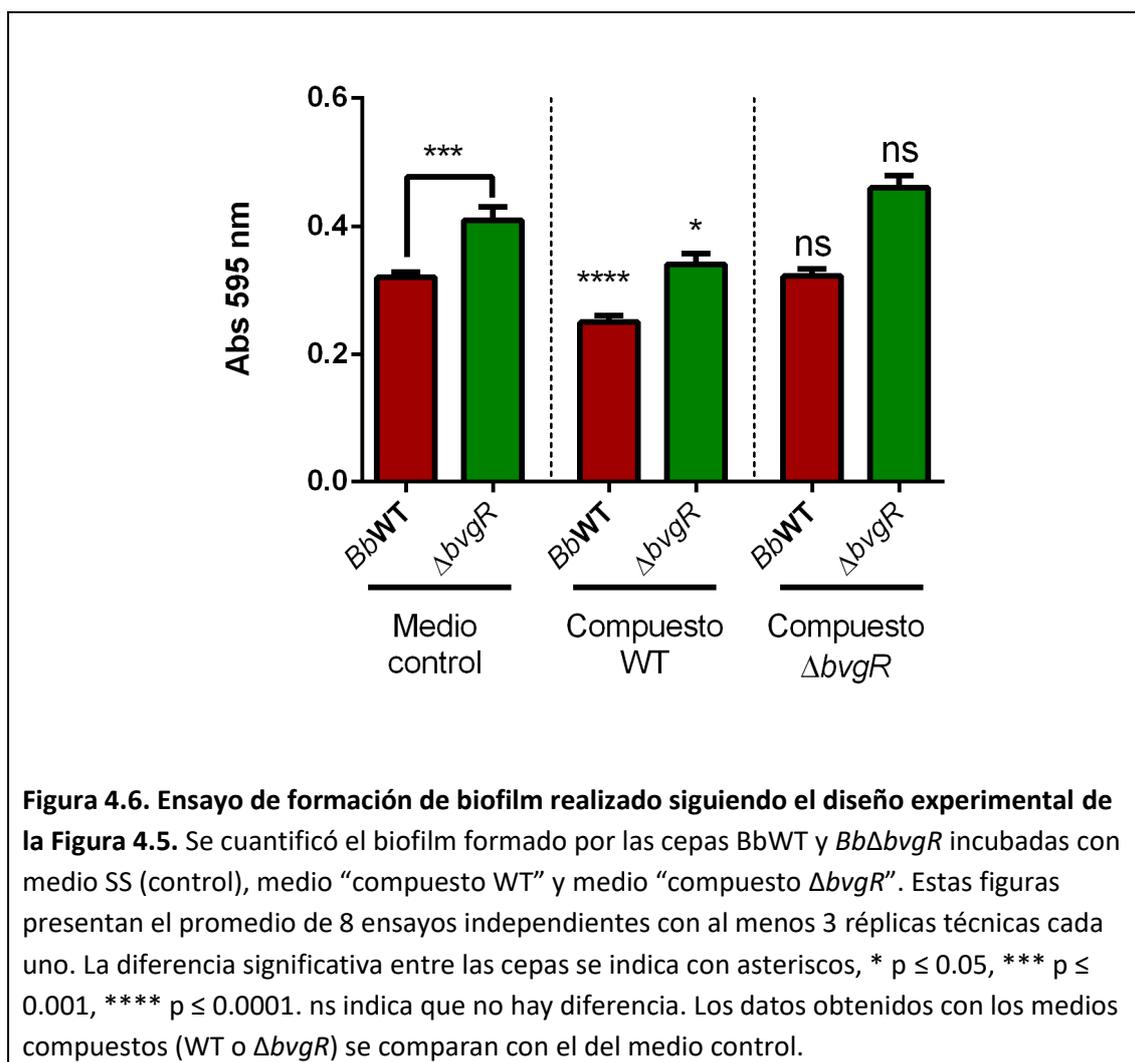
Como se detalló en la introducción general de esta Tesis, una vez secretada la ACT puede permanecer asociada a la membrana plasmática o liberarse al medio extracelular. Tras observar que la cantidad de ACT secretada al medio difería entre *BbWT* y *Bb $\Delta bvgR$* decidimos determinar si la cantidad de ACT asociada a membrana también era distinta entre las cepas en estudio. Para detectar las proteínas en la superficie celular realizamos ensayos de *dot blot* con célula entera con el mismo anticuerpo monoclonal anti-ACT que se utilizó en el ensayo de *Western blot*. Las muestras analizadas por *dot blot* constaron de suspensiones bacterianas obtenidas a partir de cultivos líquidos en condiciones no desnaturizantes, en las que las bacterias fueron previamente lavadas con el fin de eliminar restos de bacterias lisadas y proteínas del sobrenadante del cultivo (ver Materiales y Métodos). De esta manera, el anticuerpo es capaz de detectar la proteína expuesta en la superficie celular. Esta técnica ya ha sido utilizada por otros autores para determinar la abundancia de otras proteínas de superficie (Newell, Monds and Toole, 2009; Ambrosio *et al.*, 2016). En el panel C de la Figura 4.4 se puede observar que las

muestras de *BbΔbvgR* presentaron una mayor cantidad de ACT asociada a membrana que las muestras de *BbWT*, de acuerdo a la intensidad de señal del *dot blot*, y que la señal es dependiente de la cantidad de bacteria sembrada en cada posición. En conjunto, estos resultados indican que *BbΔbvgR* presenta mayor cantidad de ACT en la superficie bacteriana y secreta una menor cantidad de dicha proteína al medio de cultivo en comparación con la cepa *wild type*.

Teniendo en cuenta que ACT inhibe la formación de biofilm y habiendo determinado que *BbΔbvgR* presenta un perfil de distribución de ACT diferente al de la cepa *wild type* decidimos estudiar si estas diferencias podrían estar involucradas con el aumento en la capacidad de formación de biofilm que presenta esta cepa. Si la ACT presente en el sobrenadante del cultivo es capaz de inhibir la formación de biofilm, las diferencias encontradas entre los sobrenadantes de las cepas *BbWT* y *BbΔbvgR* podrían explicar las diferencias observadas en la formación e biofilm. Para ello diseñamos un ensayo de formación de biofilm utilizando como fuente de ACT los sobrenadantes de cultivos de las cepas *BbWT* y *BbΔbvgR*. A partir de estos sobrenadantes se prepararon mezclas compuestas por volúmenes iguales de medio SS nuevo y de sobrenadante obtenido de un cultivo líquido de *BbWT* o *BbΔbvgR*, como se diagrama en la Figura 4.5. A los medios de cultivo “compuestos” se los denominó medio “compuesto WT” o “compuesto $\Delta bvgR$ ” dependiendo de a partir de qué cepa fueron obtenidos los sobrenadantes. Los medios compuestos fueron utilizados en los ensayos de biofilm de ambas cepas, es decir, que tanto *BbWT* como *BbΔbvgR* fueron incubadas con los dos medios de cultivo “compuestos” y con medio SS nuevo como control.



De acuerdo a los resultados previos, nuestra hipótesis es que la diferencia en la concentración de ACT entre los sobrenadantes de la cepa *BbΔbvgR* y la cepa *wild type* está relacionada con la distinta capacidad de formar biofilm que presentan estas cepas. En este sentido, sería de esperar que el sobrenadante con mayor cantidad de ACT, obtenido a partir de la cepa *wild type*, inhiba la formación de biofilm. En el caso del sobrenadante obtenido a partir de la cepa *BbΔbvgR*, que contiene menor cantidad de ACT, esperaríamos que la inhibición de la formación de biofilm sea menor o nula.



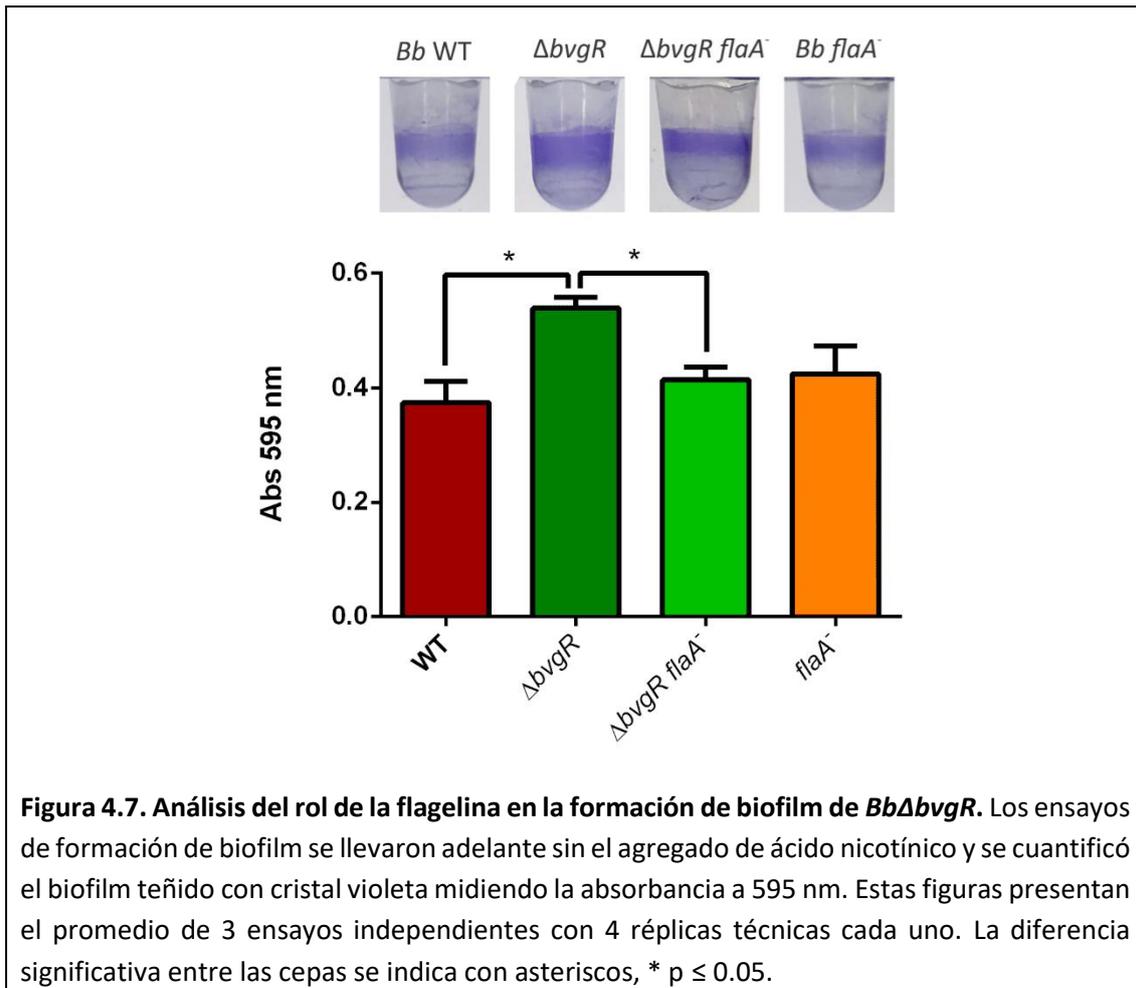
Los resultados obtenidos con el nuevo diseño experimental se muestran en la Figura 4.6. Tanto la cepa *BbWT* como *BbΔbvgR* presentaron una disminución en los biofilms formados con el medio “compuesto WT” respecto a los biofilms formados con medio SS. Por el contrario, cuando se utilizó el medio “compuesto *ΔbvgR*” como medio de cultivo el nivel de biofilm

formado por ambas cepas fue indistinguible del de los correspondientes controles. Este resultado indica que el sobrenadante de *Bb*WT inhibe la formación de biofilm, posiblemente debido a la ACT presente en él. No obstante, no podemos afirmar que la reducción en la cantidad de ACT liberada al medio extracelular en la cepa *BbΔbvgR* respecto a la cepa *wild type* sea efectivamente un factor que afecte directamente la formación de biofilm de esta cepa en los ensayos tradicionales de formación de biofilm. Sin duda, este resultado es interesante y amerita seguir siendo estudiado.

3. Participación de la flagelina

En los capítulos anteriores se presentó evidencia de que la proteína BvgR regula la movilidad de *B. bronchiseptica* reprimiendo la expresión de los reguladores maestros del flagelo FlhDC e inhibiendo la expresión de flagelina a nivel transcrpcional, lo cual fue confirmado por la presencia de esta proteína en *BbΔbvgR* en fase virulenta. Considerando que en numerosas bacterias, incluyendo *B. bronchiseptica*, el flagelo es un elemento fundamental para la etapa de adhesión reversible a la superficie en el inicio del proceso de formación de biofilm (Haiko and Westerlund-Wikström, 2013; Belhart *et al.*, 2019), decidimos evaluar la relevancia del flagelo durante la formación de biofilm del mutante *BbΔbvgR*. Si la expresión constante del flagelo en el mutante *BbΔbvgR* influyese en el incremento de la formación de biofilm en esta cepa de manera sustancial, consideramos que al mutar el flagelo no debería observarse dicho incremento.

Se ensayó la capacidad de formar biofilm de las cepas *Bb*WT, *BbΔbvgR*, *BbflaA-* y *BbΔbvgRflaA-* en la condición de 0 mM de ácido nicotínico. Los ensayos de biofilm se realizaron de manera idéntica a los ensayos del primer inciso. Como se puede observar en la Figura 4.7 la cepa *BbflaA-* presentó un comportamiento similar a la cepa *wild type*, resultado que concuerda con lo reportado por Nicholson y colaboradores (Nicholson, Conover and Deora, 2012b). Sin embargo, el doble mutante *BbΔbvgRflaA-* no se comportó como la cepa *BbΔbvgR*. El biofilm formado por la cepa *BbΔbvgRflaA-* fue menor que el formado por la cepa *BbΔbvgR* y resultó indistinguible al de la cepa *Bb*WT. De estos resultados se desprende que el flagelo, expresado de manera constitutiva en *BbΔbvgR* pero reprimido en la cepa *wild type* durante la fase virulenta, juega un rol relevante en la promoción de la formación de biofilm de *BbΔbvgR* en dicha fase.



Conclusiones

En este capítulo nos enfocamos en la capacidad de BvgR de regular un fenotipo importante en *Bordetella* y potencialmente asociado a su persistencia en el huésped: la formación de biofilm. Este fenotipo depende de múltiples factores entre los que se incluyen el flagelo, adhesinas como FHA y BrtA, la ACT, el exopolisacárido y el ADN extracelular (Yasuhiko Irie, Mattoo and Ming H Yuk, 2004; Conover, Mishra and Deora, 2011; Conover *et al.*, 2012; Nicholson, Conover and Deora, 2012a; Ambrosis *et al.*, 2016). Asimismo, está regulado por distintos sistemas entre los que se destacan el sistema BvgAS y el segundo mensajero c-di-GMP (Yasuhiko Irie, Mattoo and Ming H Yuk, 2004; Belhart *et al.*, 2019).

Teniendo en cuenta que en el capítulo 2 vimos que BvgR es capaz de regular proteínas involucradas en la formación de biofilm, especialmente las del aparato flagelar y las del sistema Lap, y que BvgR podría ser la conexión entre el sistema BvgAS y el metabolismo de c-di-GMP, decidimos evaluar si BvgR está implicado en la formación de biofilm.

Iniciamos nuestro estudio realizando ensayos de formación de biofilm con las cepas *BbWT* y *BbΔbvgR* en placas multipocillo de PVC con la adición de distintas concentraciones de ácido nicotínico. Este ensayo nos demostró que la delección de *bvgR* no tuvo el mismo efecto en todas las condiciones analizadas. Mientras que a 0, 0,5, y 2 mM de ácido nicotínico la mutante *BbΔbvgR* formó mayor cantidad de biofilm que la cepa *BbWT*, en la condición de 1 mM el resultado fue el inverso. *A priori* podría parecer raro que BvgR regule la formación de biofilm en concentraciones de ácido nicotínico mayores a 0 mM, pero cabe recordar que el patrón de expresión de *bvgR* es similar al de *fhaB* (Merkel *et al.*, 2003). Esto significa que todavía se expresa cuando se incuba con bajas concentraciones de un agente modulador como MgSO₄ o ácido nicotínico. Considerando que la condición de 1 mM de ácido nicotínico (fase intermedia) se ha reportado como la fase con máxima expresión de biofilm, es probable que BvgR regule positivamente una o más proteínas involucradas principalmente en la formación de biofilm en la condición de 1 mM y que por ello la cepa *BbWT* forme más biofilm en dicha condición.

Por otro lado, realizamos un ensayo de cinética de formación de biofilm en la condición de 0 mM, que es cuando la expresión de *bvgR* es máxima. En este ensayo observamos que el incremento en la cantidad de biofilm formado por la cepa *BbΔbvgR* respecto a la cepa *wild type* ya es apreciable a las 6 horas de incubación. Por lo tanto, aquellos factores que estimulan la formación de biofilm de *BbΔbvgR* son importantes en la primera etapa del biofilm. Al analizar la velocidad de crecimiento del biofilm a partir de la pendiente entre puntos correspondientes a tiempos consecutivos observamos que entre las 6 y 24 horas el biofilm de *BbΔbvgR* crece a mayor ritmo que el de la cepa *wild type*, aunque luego las pendientes se igualan. En este sentido, la etapa de mantenimiento del biofilm sería similar entre las cepas, pero no pudimos evaluar la etapa de desarmado ya que este proceso no ocurrió dentro del intervalo de 72 horas analizado.

Habiendo determinado que la cepa *BbΔbvgR* formaba más biofilm que *BbWT* y que la diferencia se observaba entre las primeras 24 horas de incubación, nos propusimos identificar factores regulados por BvgR que intervienen en la formación de biofilm. Con la idea de que podría haber una diferencia en la cantidad de proteína ACT entre *BbΔbvgR* y *BbWT*, a partir de resultados obtenidos en el ensayo en ratones que se describe en el capítulo 6, decidimos en primer lugar caracterizar la cantidad y distribución de ACT en las cepas. Para ello detectamos la ACT en muestras de sobrenadante de cultivo, de células enteras y de proteínas obtenidas por ruptura celular con un anticuerpo monoclonal. Estos *blotting* nos demostraron que la cepa *BbΔbvgR* presenta mayor ACT en la superficie bacteriana y que secreta menor cantidad al medio de cultivo que la cepa *BbWT*. La localización de ACT en la membrana de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* ha sido objeto de estudio por diferentes laboratorios. Esto se debe a que se ha descrito que son su localización y su interacción con otras proteínas de membrana las que

regulan otros fenotipos como la formación de biofilm o la actividad tóxica de ACT. En particular, la interacción de ACT con FHA es capaz de inhibir la formación de biofilm. Es por esto que resulta interesante nuestra observación de que BvgR es capaz de regular su localización. De esta manera, podemos concluir que el sistema BvgASR es capaz de regular la transcripción de ACT (a través de BvgAS) y su localización (a través de BvgAS y de BvgR), regulando así en su conjunto la actividad de ACT.

Teniendo esto en cuenta y sabiendo que la ACT secretada, pero no la adherida a la membrana, inhibe la formación de biofilm al interactuar con FHA planificamos un nuevo diseño experimental para evaluar si la diferencia en la formación de biofilm entre estas cepas se debe a la ACT. Este nuevo esquema experimental constó en utilizar como medio de cultivo para la formación de biofilm de *BbΔbvgR* o *BbWT* a un nuevo medio compuesto 50% de SS y 50% de sobrenadante de cultivo. Como resultado de este nuevo esquema se observó que el medio compuesto con el sobrenadante de *BbWT* disminuyó la cantidad de biofilm formado por ambas cepas con respecto a sus respectivos controles en medio SS. En el caso del medio compuesto con el sobrenadante de *BbΔbvgR*, que contiene menos ACT que el de *BbWT*, el biofilm formado por ambas cepas fue indistinguible al de sus respectivos controles en medio SS. Este resultado sugiere que la disminución en la secreción de ACT al medio extracelular por parte de *BbΔbvgR* repercute positivamente en la formación de biofilm cuando se compara con la cepa *wild type*. No obstante, estos resultados no alcanzan para confirmar ninguna hipótesis, sino que deben hacerse más experimentos para llegar a una conclusión definitiva.

En este sentido, pensamos qué experimentos podrían hacerse, pero no pudimos llevarlos adelante debido a la imposibilidad de ir a trabajar durante la cuarentena. En primer lugar, planteamos repetir los ensayos con medios compuestos con sobrenadantes utilizando como control el sobrenadante de una cepa deficiente en *cyoA* y que no secreta ACT. De esta manera podríamos evaluar si un sobrenadante sin ACT afecta la formación de biofilm en ambas cepas. Esto nos indicaría si hay otra proteína presente en el sobrenadante de *BbWT* pero no en el de *BbΔbvgR* que afecte la formación de biofilm. En caso de que esto no suceda, podemos atribuirle el efecto a la ACT. Otros experimentos que se podrían plantear sería repetir los ensayos con una cepa que no exprese FHA, considerando que ACT inhibe la formación de biofilm al interactuar con esta proteína, o bien, utilizar anticuerpos anti-ACT o anti-FHA que bloqueen la interacción entre estas proteínas (Hoffman *et al.*, 2017).

En paralelo, decidimos evaluar la influencia del flagelo durante el proceso de formación de biofilm de la cepa *BbΔbvgR*. Como ya se demostró a lo largo de este trabajo de Tesis, la cepa *BbΔbvgR* expresa los genes del aparato flagelar y sintetiza flagelo en la fase virulenta de la bacteria, a diferencia de la cepa *wild type*. Además se mencionó que el flagelo es un componente

necesario durante el primer paso de la formación de biofilm y que se expresa en las primeras horas de este proceso para reprimirse transcurridas las 24 horas de incubación (Nicholson, Conover and Deora, 2012a). Con el objetivo de determinar si el flagelo era requerido para que la cepa *BbΔbvgR* incremente su capacidad de formar biofilm respecto a *BbWT* realizamos ensayos de biofilm con cepas *BbWT* y *BbΔbvgR* que no expresen flagelina, *BbflaA-* y *BbΔbvgRflaA-*. La cepa *BbΔbvgRflaA-* formó una menor cantidad de biofilm que la cepa *BbΔbvgR* y resultó indistinguible al biofilm formado por las cepas *BbWT* y *BbflaA-*. Este resultado se correlaciona con la cinética de formación de biofilm de las cepas *BbWT* y *BbΔbvgR*, dado que ya se había reportado que el flagelo es importante en las primeras horas de este proceso y fue cuando el biofilm formado por la cepa *BbΔbvgR* creció más rápidamente. Es notable que cuando *BbΔbvgR* no expresa flagelo el biofilm formado es similar al formado por la cepa *wild type*; esto significa que es indispensable para que esta cepa pueda incrementar su capacidad de formar biofilm.

Todos estos resultados ponen en evidencia que BvgR regula negativamente la formación de biofilm, principalmente en fase virulenta. Este resultado es interesante porque sugiere que BvgR, expresada en fase virulenta y durante la infección, podría evitar que la formación de biofilm exacerbada *in vivo* perjudique el proceso de infección. De acuerdo al ensayo de cinética de formación de biofilm la regulación por parte de BvgR ocurre dentro de las primeras 24 horas de incubación. Esto se correlaciona con lo reportado por Nicholson y colaboradores, quienes observaron que la expresión de *bvgR* disminuye durante las primeras 6 horas de la formación de biofilm en comparación con una condición de cultivo líquido (Nicholson, Conover and Deora, 2012a). Una disminución en la expresión de *bvgR* permitiría la síntesis del flagelo, necesario para la primera etapa de la formación de biofilm, lo cual concuerda con lo observado en el biofilm del mutante *BbΔbvgR* cuando sintetiza o no el flagelo. Es probable que la regulación por parte de BvgR sea necesaria para que la formación de biofilm no sea exagerada. En este sentido, si se confirmase nuestra hipótesis de que una menor cantidad de ACT secretada por parte de la cepa *BbΔbvgR* contribuye a la formación de biofilm, se podría pensar que una vez que la expresión de *bvgR* se desreprime durante la formación de biofilm (después de las 24 horas) la secreción de ACT ligeramente estimulada por BvgR controla la cantidad de biofilm ya formado.

CAPITULO 5

Descripción de factores virulencia
regulados por BvgR: Sistema de secreción
Tipo III

Introducción

El sistema de secreción tipo III (SST3) está ampliamente distribuido entre las bacterias Gram negativas y permite secretar proteínas efectoras dentro de las células eucariotas, alterando las funciones de señalización de la célula huésped. En el caso de *Bordetella* el SST3 juega un papel importante para la persistencia en el hospedador ya que no sólo tiene un efecto citotóxico sobre células fagocíticas y no fagocíticas, sino que además modula la respuesta inmune (Kamanova, 2020).

En el capítulo 2 se mencionó que quince genes del SST3 presentaron un menor número de transcriptos en la cepa *BbbvgR* que en la *wild type* en el ensayo de RNA-seq, habiéndose corroborado la disminución en el nivel de ARNm de *bsp22* por qRT-PCR. Para analizar si esta diferencia también ocurre a nivel de proteína, decidimos detectar mediante ensayos de *Western blot* a Bsp22 tanto en el sobrenadante de la cepa de *BbWT* como en el de la cepa *BbΔbvgR*, utilizando anticuerpos policlonales α -Bsp22. Los *blotting* se hicieron en muestras de sobrenadante ya que Bsp22 es el polipéptido del SST3 más abundante en los sobrenadantes de *B. bronchiseptica* cultivada *in vitro* (Ming Huam *et al.*, 2000). Como se observa en la Figura 5.1, cuando se compararon las intensidades de las bandas correspondientes a Bsp22, se observó que la cepa *BbWT* secretó mayor cantidad al medio extracelular que la cepa *BbΔbvgR*. Esto confirma los resultados previos mostrando que BvgR es capaz de regular positivamente la expresión del SST3 de *B. bronchiseptica*.

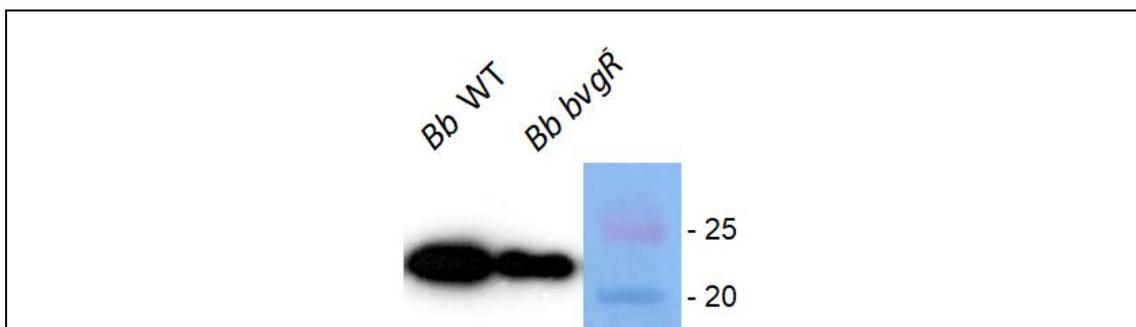
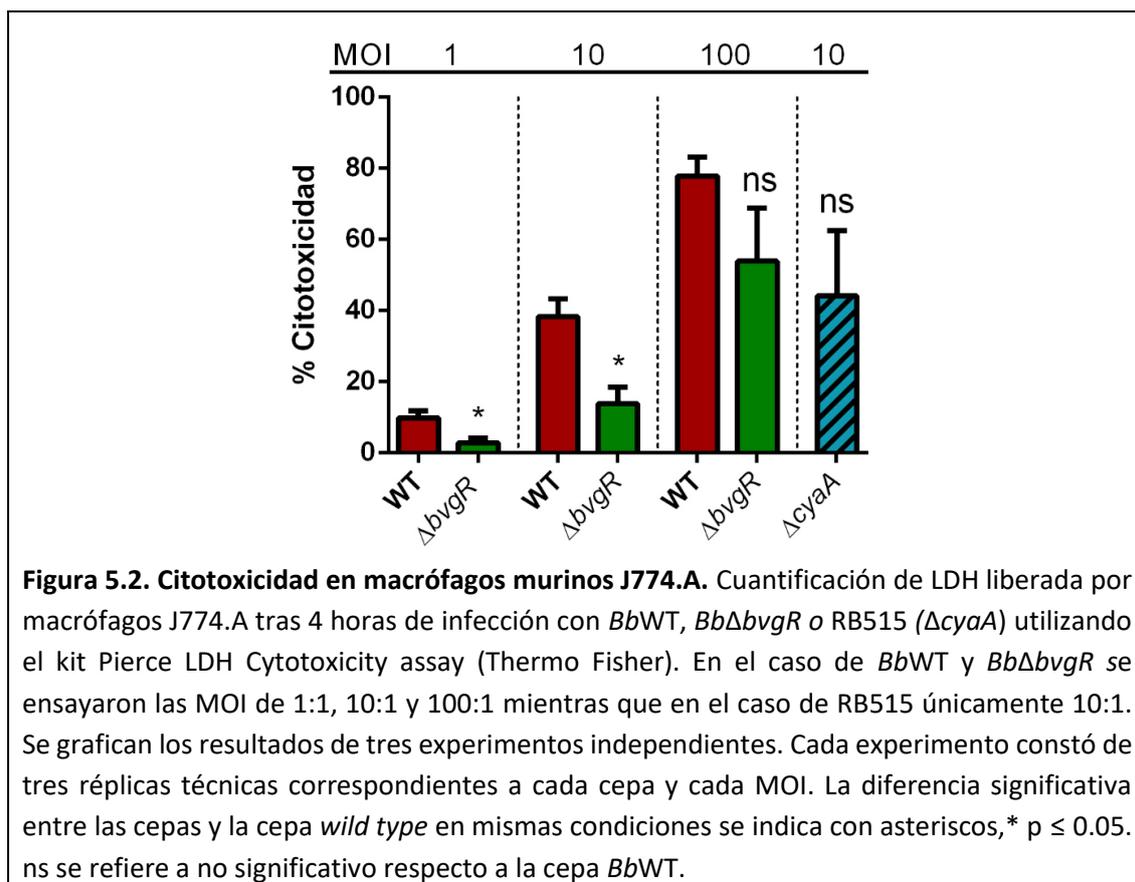


Figura 5.1. Detección de Bsp22 en sobrenadantes obtenidos a partir de cultivos líquidos de *BbWT* y de *BbΔbvgR*. Los cultivos líquidos de medio SS sin el agregado de agentes moduladores fueron inoculados con *BbWT* o *BbΔbvgR* y tras 16 horas fueron cosechados. Las muestras fueron centrifugadas y filtradas. La detección de la proteína Bsp22 en los sobrenadantes obtenidos se realizó por *Western blot*, utilizando un anticuerpo α -Bsp22 anti-ratón policlonal conjugado a HRP. El marcador de peso molecular utilizado fue el Precision Plus Protein Dual Color (BioRad).

1. Citotoxicidad

Como se describió en la sección anterior, el mutante *BbΔbvgR* presenta un menor nivel de expresión del locus *bsc* del SST3, así como una menor concentración de proteína Bsp22 en el medio extracelular en comparación a la cepa *wild type*. Con el fin de estudiar si la disminución de la secreción de Bsp22 se traducía en una disminución de la actividad citotóxica reportada para el SST3, se prosiguió a evaluarla mediante un ensayo *in vitro*.

Basándonos en reportes anteriores evaluamos la actividad del SST3 de *Bordetella* mediante la inducción de la muerte celular *in vitro* (Yuk, Harvill and Miller, 1998; Ming Huam *et al.*, 2000; Mattoo *et al.*, 2004; Kurushima, Kuwae and Abe, 2012a) en una línea celular de macrófagos murinos J774.A, usando el ensayo de liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) al medio. Los ensayos de infección se llevaron adelante con distintas multiplicidades de infección (MOI) de 1:1, 10:1 y 100:1. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Figura 5.2.



Como ya ha sido reportado, el porcentaje de citotoxicidad inducido por *B. bronchiseptica* es dependiente de la MOI utilizada (Fennelly *et al.*, 2008). En el caso de la cepa *wild type*, se obtuvo un porcentaje de citotoxicidad del 10% para una MOI de 1; del 38% para una MOI de 10

y del 78% para una MOI de 100. Al comparar los valores obtenidos entre la cepa *BbWT* y *BbΔbvgR*, se puede observar que las células infectadas con *BbΔbvgR* presentaron porcentajes de citotoxicidad significativamente más bajos que *BbWT* a las MOI de 1 y 10 mientras que, a una MOI de 100 no hubo diferencias significativas entre las cepas. Para descartar que el efecto citotóxico se deba a la toxina ACT, se agregó como control una cepa de *B. bronchiseptica* RB50 mutante delecional en el gen de la ACT (*RB515 ΔcyaA*) con MOI de 10. Esta cepa presentó niveles de citotoxicidad similares a los obtenidos con la cepa *BbWT*, como se muestra en la Figura 5.2.

En las micrografías de la Figura 5.3 se muestran las células J774.A finalizadas las 4 horas de incubación del ensayo de citotoxicidad como representación visual del ensayo. Las células sanas lucen redondas y con borde iluminado mientras que en el caso de las lisadas, se ven los residuos de la célula en un tono opaco. En la figura puede observarse el incremento en la cantidad de células lisadas con el aumento de la MOI, así como la diferencia entre la cepa *BbWT* y *BbΔbvgR*.

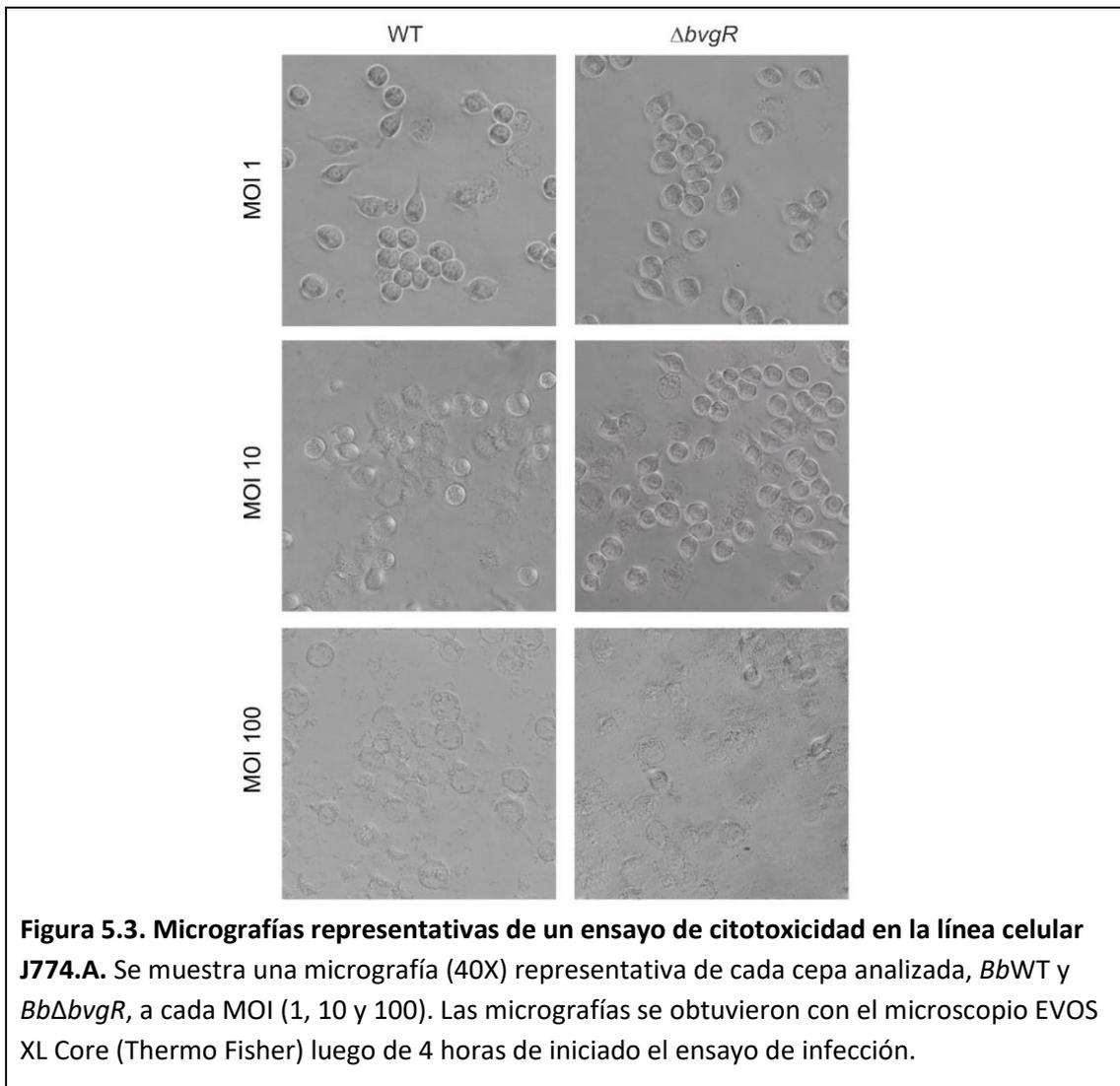


Figura 5.3. Micrografías representativas de un ensayo de citotoxicidad en la línea celular J774.A. Se muestra una micrografía (40X) representativa de cada cepa analizada, *BbWT* y *BbΔbvgR*, a cada MOI (1, 10 y 100). Las micrografías se obtuvieron con el microscopio EVOS XL Core (Thermo Fisher) luego de 4 horas de iniciado el ensayo de infección.

Estos resultados ponen en evidencia que la cepa *BbΔbvgR* es menos citotóxica que la cepa *wild type* contra la línea de macrófagos J774.A. Este fenómeno no se debe a una diferencia en los niveles de actividad de la ACT, sino que estaría relacionado con los distintos niveles de expresión de las proteínas del SST3.

Conclusiones

En este capítulo nos enfocamos en el primer fenotipo regulado positivamente por BvgR descrito hasta el momento. En la introducción de este trabajo de Tesis se mencionó que desde el primer reporte de BvgR, hace ya más de 25 años, se consideró que esta proteína cumplía un rol exclusivamente represor. Nuestros resultados del ensayo de RNA-seq, expuestos en el capítulo 2, demostraron que BvgR es capaz de regular positivamente algunos genes, entre los cuales se destacan los del SST3.

En este capítulo expusimos que la regulación de BvgR afecta también la cantidad de proteínas del SST3 secretadas. En concordancia con el análisis transcriptómico cuando se detectó a Bsp22 por *Western blot* se observó que la cepa *BbWT* presenta mayor secreción de esta proteína efectora que *BbΔbvgR*.

A su vez, demostramos que la regulación del SST3 por parte de BvgR es relevante fisiológicamente. La disminución en la secreción de proteínas del SST3 en la cepa *BbΔbvgR* se corresponde con una disminución en la actividad del SST3 (Figura 5.1). Los ensayos de citotoxicidad en una línea celular de macrófagos murinos demostraron que la cepa *BbWT* induce un mayor nivel de citotoxicidad que la cepa *BbΔbvgR*. Dado que se usó como control una cepa deficiente en ACT pudimos descartar que dicha diferencia fuera producto de la ACT y, por lo tanto, podríamos inferir que la diferencia en los valores de citotoxicidad se debe a una menor cantidad de proteínas del SST3 en la cepa *B ΔbvgR* respecto de la *wild type*. No se puede descartar que otros factores, regulados por BvgR, también participen de las diferencias observadas

Estos resultados refuerzan la idea de que uno de los principales factores de virulencia de *Bordetella*, el SST3, es regulado por múltiples factores. A los ya descritos, como el sistema de dos componentes BvgAS (Yuk, Harvill and Miller, 1998), la participación de la chaperona Hfq (Bibova *et al.*, 2015), la presencia de hierro (Kurushima, Kuwae and Abe, 2012b), la regulación por segundos mensajeros (Manuscrito en preparación) y la incubación en sangre (Gestal *et al.*, 2018) nosotros sumamos la regulación por parte de BvgR. Esto indica claramente que la

regulación de este sistema en *Bordetella* es importante. Asimismo, es de esperar una interacción entre todos estos sistemas. Como se mencionó en la introducción general, el SST3 induce la producción de IL-10 durante la infección y lleva a un estado de semi-maduración a las células dendríticas *in vitro*. Además, este sistema resulta importante durante la colonización y la persistencia a largo plazo. Esto se determinó en un ensayo de infección en ratones en el cual mutantes deficientes en SST3 no fueron capaces de sobrevivir en tráquea a largo plazo. La comprensión de los mecanismos involucrados permitiría entender de qué manera *Bordetella* regula la actividad del SST3 durante el proceso de infección.

CAPITULO 6

Estudio del rol de BvgR en la infección y en la respuesta inmune en un modelo murino

Introducción

En los capítulos previos se presentó que el espectro de genes regulados por BvgR es muy amplio y cómo esta proteína está involucrada en la regulación de procesos como la movilidad, la formación de biofilm, la actividad del sistema de secreción tipo III y en la citotoxicidad de *B. bronchiseptica*. Considerando que los procesos mencionados, así como algunos genes regulados por BvgR, están involucrados en la patogénesis de *B. bronchiseptica* nos propusimos evaluar el rol de esta proteína en el proceso infeccioso. Para ello, evaluamos la capacidad de infectar y colonizar del mutante $\Delta bvgR$ en el modelo murino.

Este no es el primer ensayo de colonización de un mutante en *bvgR* en bacterias del género *Bordetella*, pero como se explicará más adelante, el diseño experimental resulta más abarcativo que los estudios ya reportados. Martínez de Tejada y colaboradores fueron los primeros en publicar un trabajo en el que se incluía un estudio de colonización en ratones BALB/cAnNCR con una cepa de *B. pertussis* (18323) con el gen *bvgR* delecionado (Martínez de Tejada *et al.*, 1998a). En este estudio los ratones fueron infectados con 1×10^4 UFCs de *B. pertussis wild type* o mutante $\Delta bvgR$ y se realizó el recuento bacteriano en la cavidad nasal, la tráquea y los pulmones a los días 11, 26 y 35 post-infección. Encontraron una moderada pero estadísticamente significativa disminución en el número de bacterias del mutante $\Delta bvgR$ recuperadas de la tráquea y los pulmones respecto al de la cepa *wild type* en el día 11 post-infección, mientras que en los tiempos posteriores se recuperaron la misma cantidad de bacterias de ambas cepas. De esta manera, los autores concluyeron que la expresión ectópica de algunos genes *vrgs*, regulados por BvgR, inhiben la colonización de la tráquea y los pulmones por parte de *B. pertussis*. Este resultado va en línea con otro trabajo del mismo grupo de investigación en el cual reportaron que la expresión constitutiva de un *vrg* en *B. bronchiseptica*, el flagelo, produjo una drástica disminución de la colonización traqueal en ratas al día 26 post-infección, en comparación con la cepa *wild type* y con cepas mutantes en el aparato flagelar (Akerley, Cotter and Miller, 1995). Poco tiempo después, Merkel y colaboradores publicaron un trabajo en el que evaluaron la capacidad de colonizar el tracto respiratorio de ratones BALB/cAnNCR por parte de distintas cepas de *B. pertussis*, entre las cuales incluyeron un mutante por deleción en *bvgR*, en un modelo de infección por aerosol (Merkel, Barros and Stibitz, 1998). Si bien recuperaron la misma cantidad de bacterias mutante $\Delta bvgR$ que *wild type* de los pulmones y tráquea a los 14 días post-infección, la cepa $\Delta bvgR$ indujo niveles más bajos de leucocitosis que la cepa *wild type* a los días 7 y 14 post-infección. Más aun, los ratones infectados con la cepa $\Delta bvgR$ presentaron un nivel de sobrevivencia del 55% tras 21 días de infección mientras que el 100% de los ratones infectados con la cepa *wild type* no sobrevivió. Por último, la Dra. Fernández, directora de este trabajo de Tesis, reportó que una cepa de *B. bronchiseptica* a la que se le interrumpió el gen *bvgR* no

presentó diferencias con la cepa *wild type* en la colonización de pulmones de ratones BALB/c hasta 55 días post-infección cuando éstos fueron inoculados con 5×10^5 UFC/50 μ l por vía intranasal (Fernández *et al.*, 2005).

En resumen, en la bibliografía disponible los experimentos en ratones con cepas deficientes en *bvgR* no presentan un panorama completo del transcurso de la infección en todo el tracto respiratorio en tiempos prolongados y tampoco incluyen un análisis profundo de la respuesta inmune inducida. Por lo tanto, nuestro objetivo fue llevar adelante un ensayo de colonización con la cepa *wild type* y con el mutante en *bvgR* de *B. bronchiseptica*, evaluando tanto el número de bacterias presentes a lo largo de todo el tracto respiratorio, así como la respuesta inmune del animal.

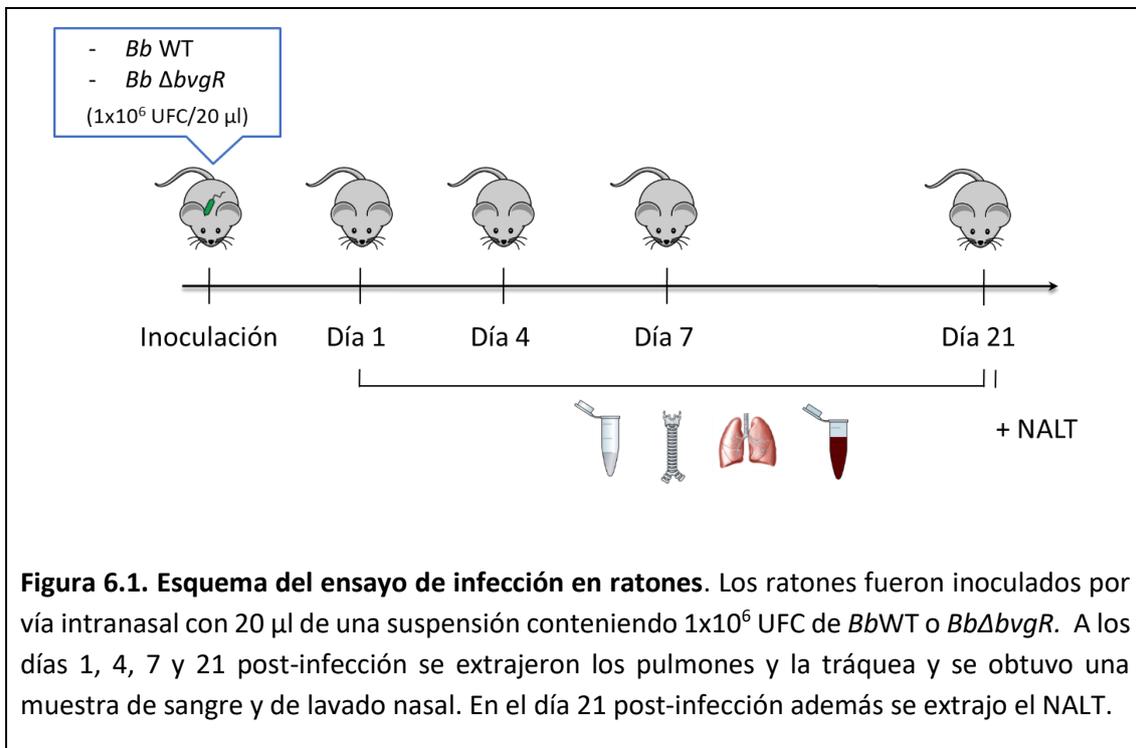
En la Figura 6.1 está diagramado el diseño experimental llevado adelante. Los ratones fueron anestesiados e infectados por vía intranasal con una suspensión bacteriana en PBS estéril conteniendo 1×10^6 UFC/20 μ l, mientras que los ratones control fueron únicamente anestesiados. Los ensayos se realizaron de manera independiente dos veces, como se explicará a continuación.

Primer ensayo: En este ensayo se utilizaron las cepas *wild type* (*BbWT*) y la cepa con el gen *bvgR* interrumpido mediante una inserción (*BbbvgR*), utilizado anteriormente por nuestro grupo (Fernández *et al.*, 2005). El avance de la infección fue analizado en los días 1, 4 y 7 post infección. Se infectaron doce ratones con cada cepa bacteriana (cuatro ratones por cada tiempo analizado) y cuatro ratones sin infectar conformaron el grupo control.

Los ratones fueron anestesiados y se les aplicó la eutanasia como se explica en Materiales y Métodos. Se colectaron los pulmones, la tráquea, el lavado nasal y una muestra de sangre de cada animal. El nivel de colonización en los pulmones, la tráquea y el lavado nasal se evaluó a través del recuento del número de colonias de *B. bronchiseptica* recuperadas a los días 1, 4 y 7 post-infección. Se determinaron las poblaciones celulares presentes en las muestras de pulmón, lavado nasal y sangre en los distintos tiempos analizados a través de citometría de flujo. En la muestra de sangre adicionalmente se determinaron las poblaciones celulares mediante un análisis de sangre con un equipo de uso veterinario (Hemavet 950FS).

Segundo ensayo: Este ensayo se realizó con la cepa *wild type* y una cepa de *B. bronchiseptica* con el gen *bvgR* delecionado (*Bb Δ bvgR*). El avance de la infección se analizó a los días 1, 4, 7 y 21 post-infección y a cada tiempo analizado se procesaron cinco ratones de cada grupo infectado (*BbWT* y *Bb Δ bvgR*) y un ratón del grupo control. Los ratones fueron tratados como en el primer ensayo, excepto en el día 21. En este día, además de realizarse el lavado nasal

con PBS estéril, se tomó una muestra del tejido linfoide asociado a nasofaringe (NALT), la cual se homogeneizó y se utilizó para el recuento bacteriano.

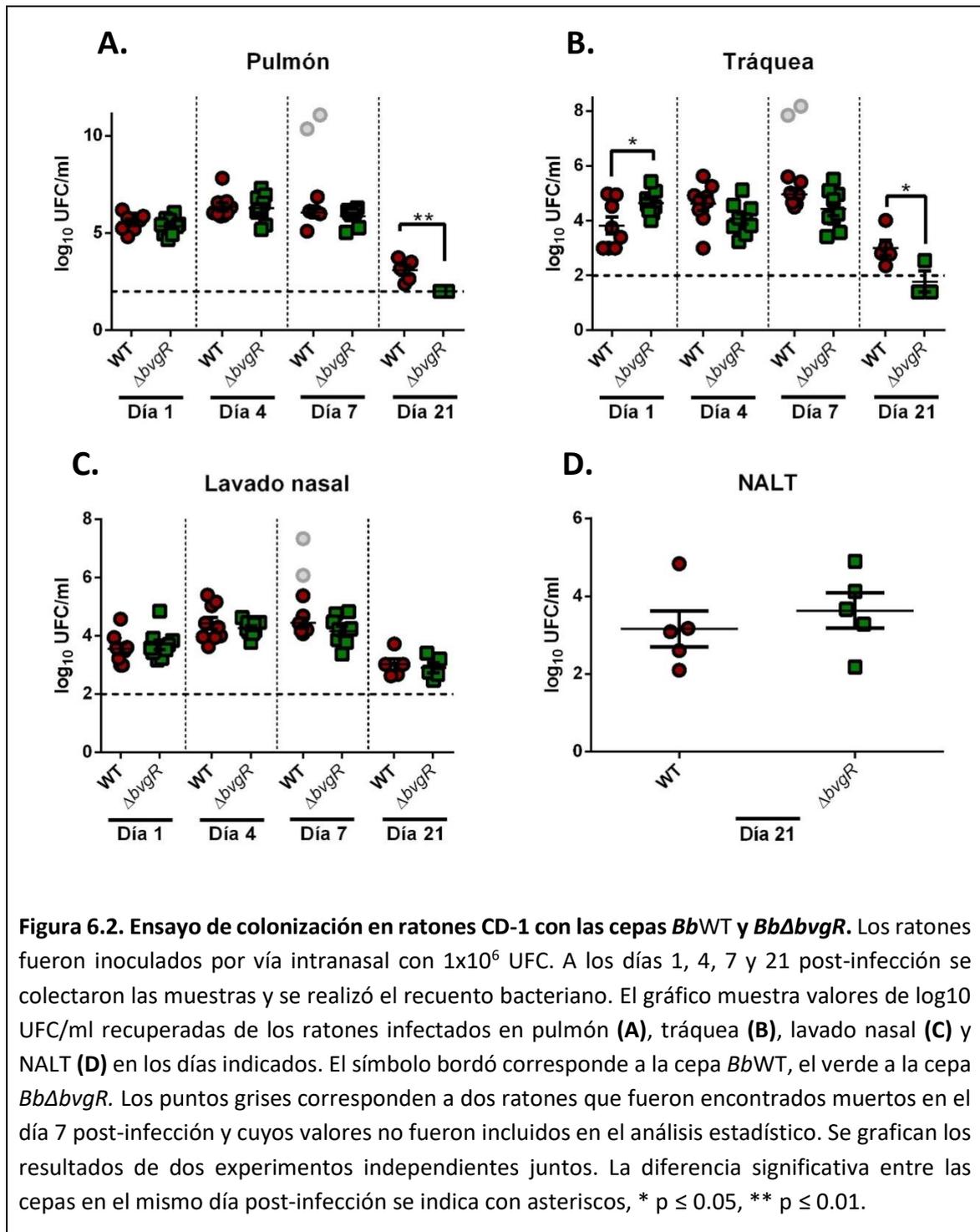


Para ambos ensayos se utilizaron ratones CD-1 hembras de 3-5 semanas de edad. Los ratones CD-1 pertenecen a un grupo exogámico y presentan variabilidad genética. Por ello, a la hora de analizar los resultados obtenidos se consideró a cada ratón como una réplica biológica. Dado que los resultados mostraron que ambos mutantes en *bvgR* se comportaron de forma indistinguible entre sí, éstas se consideraron como parte del mismo tratamiento. Por lo tanto, se definieron dos grupos de ratones infectados: uno infectado por *Bb*WT y el otro por *Bb* Δ *bvgR*, el cual incluye a los ratones infectados con *BbbvgR*⁻ y a los infectados con *Bb* Δ *bvgR*.

1. Análisis de la colonización del tracto respiratorio murino

En la Figura 6.2 se muestran los resultados del ensayo de colonización. Se puede observar que los pulmones presentaron una mayor carga bacteriana que la tráquea y la cavidad nasal. Tal como ha sido descrito para la infección de *B. bronchiseptica* en ratones, ambas cepas mostraron inicialmente un incremento en la cantidad de bacterias recuperadas de los pulmones, presentando un pico en el día 4 post-infección y luego, una lenta disminución (Gueirard, Minoprio and Guiso, 1996). Durante los primeros 7 días de infección no hubo diferencias

significativas en el número de bacterias recuperadas de ambas cepas de los pulmones infectados, así como tampoco en el número de bacterias recuperadas de la cavidad nasal (Figura 6.2, panel A y C). Al analizar los primeros días de infección en la tráquea, se puede observar a las 24 horas post-infección una moderada pero significativa disminución en el número de bacterias *Bb*WT con respecto a las *BbΔbvgR*, aunque esta diferencia desaparece para los días 4 y 7 post-infección (Figura 6.2, panel C).



En el primer ensayo de colonización se encontraron dos ratones infectados con la cepa *wild type* muertos en la mañana del séptimo día post-infección. Este episodio ocurrió a pesar de que la dosis administrada fue subletal (1×10^6 UFC/20 μ l) y probablemente se debió a la variabilidad en la susceptibilidad de los ratones. Dado que la muerte de los animales era reciente se registró el peso de los pulmones y éstos fueron procesados para poder evaluar tanto su carga bacteriana como las citoquinas presentes en sus homogenatos. Los datos obtenidos a partir de los ratones muertos no formaron parte de los análisis estadísticos, pero sí fueron graficados como círculos de color gris.

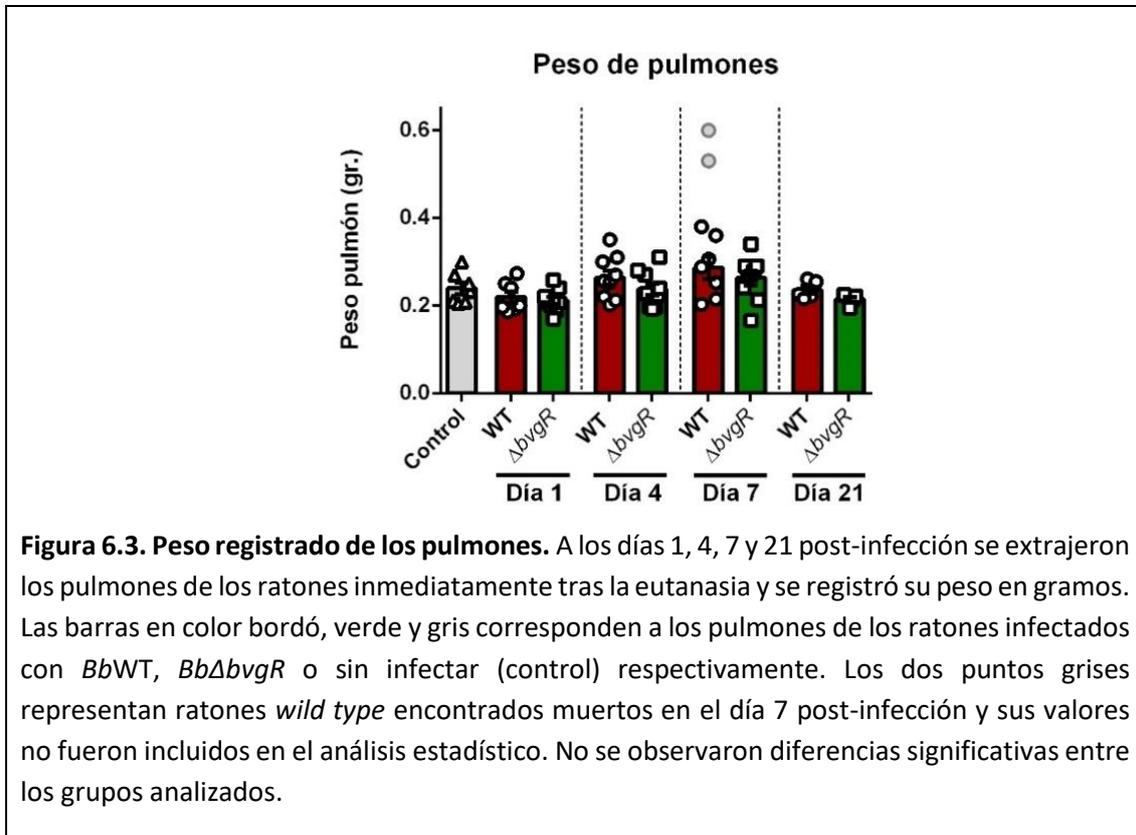
En el segundo ensayo de colonización además se evaluó el recuento bacteriano tras 21 días de infección. En este punto, no se observaron colonias en las placas correspondientes a los pulmones infectados con *Bb Δ bvgR*, lo cual indica que éstos presentaban menos de 100 bacterias viables, mientras que a partir de los pulmones infectados con la cepa *BbWT* se recuperaron 2×10^3 UFC/ml. Por otro lado, el recuento en las muestras de tráquea también mostró un menor número de *Bb Δ bvgR* recuperadas respecto al de *BbWT*, diferencia que resultó estadísticamente significativa. Por último, la cantidad de bacterias presentes en la cavidad nasal en el día 21 post-infección se determinó plaqueando tanto el lavado nasal (al igual que en los días anteriores) como el homogenato del tejido linfoide asociado a nasofaringe (NALT). En ninguno de los dos casos se observó una diferencia significativa en el número de bacterias recuperadas de ambas cepas (Figura 6.2, panel D). Esto indicaría que *Bb Δ bvgR* pudo establecerse en la cavidad nasal con la misma eficiencia que la cepa *wild type*, aun cuando las cepas presentaron distintos patrones de colonización en el tracto respiratorio inferior.

2. Evaluación de la respuesta inmune de los ratones

Para evaluar la respuesta inmune del ratón desencadenada por la infección se aplicaron distintos enfoques. En estos ensayos se incluyeron como control los datos de los ratones sin infectar.

En primera instancia, se registró el peso de los pulmones inmediatamente tras la eutanasia, el cual es utilizado como un indicador de la inflamación (Michael *et al.*, 2007; Wahlström *et al.*, 2013). Durante el procedimiento se observó que los pulmones de los ratones infectados con la cepa *wild type* presentaban un color más oscuro que aquellos de los ratones infectados con

BbΔbvgR o sin infectar. La comparación de los pesos de estos pulmones no resultó ser estadísticamente significativas tal como se puede observar en la Figura 6.3.



Por otro lado, se evaluaron las poblaciones celulares presentes en la sangre mediante dos métodos distintos: por un análisis de sangre con un equipo de uso veterinario (Hemavet 950FS) y por citometría de flujo. La técnica de citometría de flujo también fue utilizada para determinar las células del sistema inmune presentes en las muestras de lavado nasal y de homogenato de pulmón.

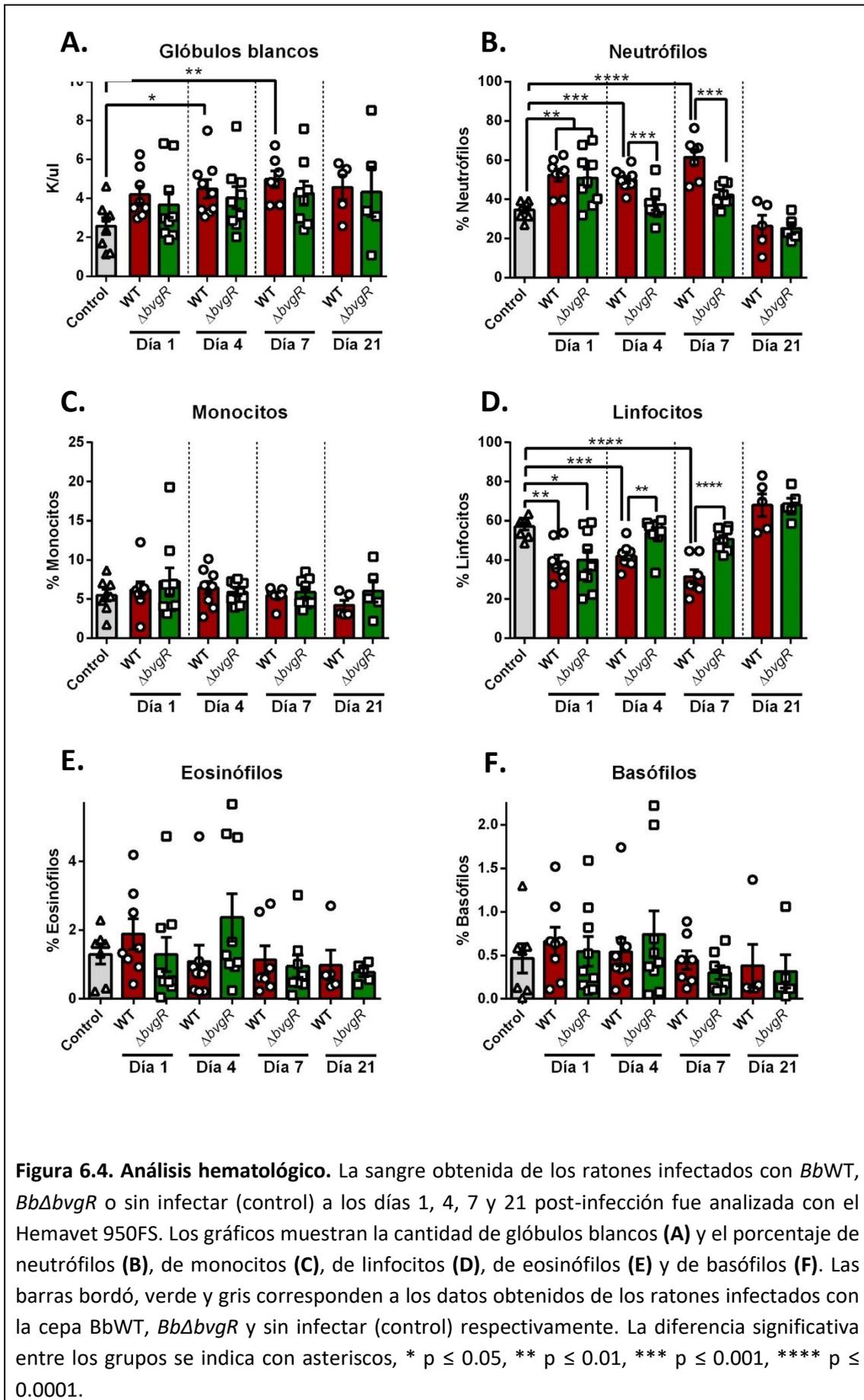
a. Análisis de sangre por contador hematológico

El Hemavet 950FS es un equipo simple que consume muy poca cantidad de muestra de sangre y que entrega los resultados de manera rápida. En los resultados se detalla el estado hematológico de la muestra, compuesto por los perfiles de leucocitos, eritrocitos y trombocitos. En este análisis se tomó en cuenta únicamente el perfil de leucocitos, el cual incluye el número de glóbulos blancos, de neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos.

En la Figura 6.4 se muestran los resultados del análisis de sangre. En el panel A se puede ver que el número de glóbulos blancos no fue diferente entre los ratones infectados con *Bb*WT

y *BbΔbvgR* a lo largo del ensayo, aunque aquellos infectados con la cepa *BbWT* presentaron un número de glóbulos blancos estadísticamente mayor respecto al control sin infectar a los días 1 y 4 post-infección.

Al analizar el porcentaje de neutrófilos en el total de glóbulos blancos (Figura 6.4, panel B), se observó un aumento significativo en aquellos ratones infectados con *BbWT* y *BbΔbvgR* con respecto al grupo control un día después de la inoculación. A los días 4 y 7 post-infección, mientras que los valores de neutrófilos en los ratones infectados con *BbΔbvgR* volvieron al nivel de los ratones control, el porcentaje de neutrófilos presentado por los ratones infectados con *BbWT* resultaron mayores que los presentados por los ratones infectados con *BbΔbvgR* y que los ratones sin infectar. Al día 21, los ratones infectados y sin infectar tuvieron el mismo porcentaje de neutrófilos, el cual se ubicó cerca del 25%.



Cuando se analizó el porcentaje de linfocitos determinado por Hemavet 950FS lo primero que se observó fue que el porcentaje resultó menor en los ratones infectados que en los ratones sin infectar (Figura 6.4, panel C). Esto se debe a la forma en la que se expresan los valores: los ratones no infectados presentan bajos valores de neutrófilos (panel B, barra gris) y por lo tanto el porcentaje de linfocitos resulta alto (panel C, barra gris); por lo contrario, los ratones infectados tienen más neutrófilos y, por ende, el porcentaje de linfocitos disminuye. Entonces, al primer día después de la inoculación los ratones infectados presentaron un menor porcentaje de linfocitos que el grupo control. En los días siguientes, el nivel de linfocitos de los ratones infectados con *BbΔbvgR* alcanzó el nivel del grupo control mientras que el de los ratones infectados con *BbWT* permaneció bajo. Al día 21, los ratones infectados y sin infectar mostraron el mismo porcentaje de linfocitos (cercano al 60%). Por último, no hubo diferencias significativas entre los grupos en los porcentajes de monocitos, eosinófilos y basófilos para ninguno de los tiempos analizados (Figura 6.4, paneles D, E y F).

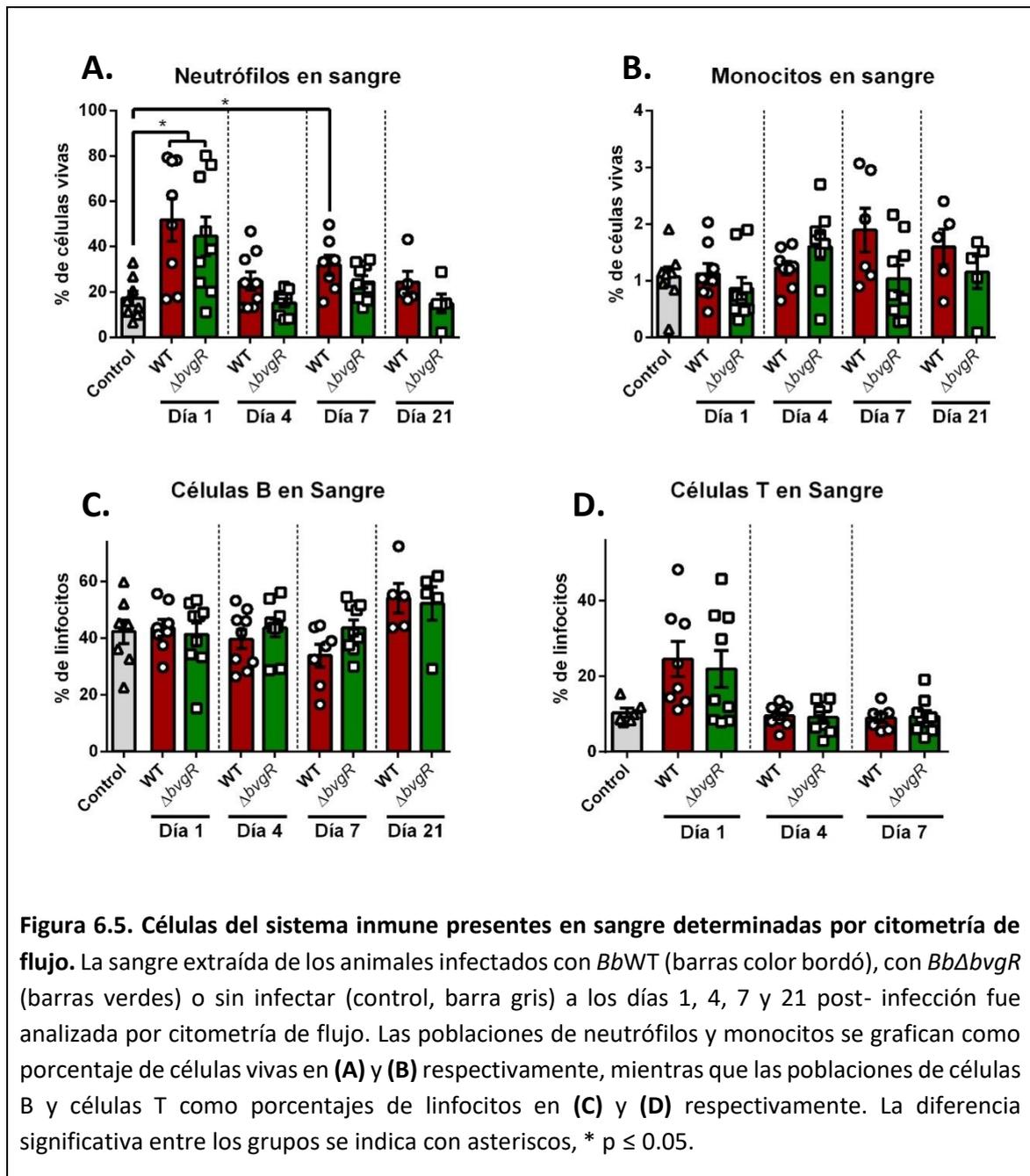
b. Poblaciones de células del sistema inmune determinadas por citometría de flujo

Como se mencionó anteriormente, la técnica de citometría de flujo se aplicó en las muestras de sangre, lavado nasal y homogenato de pulmón para cuantificar las poblaciones de neutrófilos, monocitos, células B y células T. Para ello se utilizaron como marcadores a Gr-1, CD11b, CD3e, B220 y se definieron a las poblaciones de la siguiente manera: a los neutrófilos como Gr-1 alto, CD11b⁺; a los monocitos como Gr-medio, CD11b⁺; a las células B como CD3e⁻, B220⁺ y a las células T como CD3e⁺, B220⁻ (Zaynagetdinov *et al.*, 2013). En los gráficos presentados en las Figuras 6.5, 6.6 y 6.7, los porcentajes de neutrófilos y de monocitos fueron referidos al total de células vivas mientras que los porcentajes de células B y células T fueron referidos a la población de linfocitos.

Análisis de las muestras de sangre

Los resultados obtenidos a partir de la sangre colectada se presentan en la Figura 6.5. En el panel A se puede observar un gran aumento en los valores de neutrófilos presentes en las muestras de sangre de los ratones infectados con ambas cepas (~50%) en comparación a las de los ratones sin infectar al día 1 post-infección (~20%). Luego, los valores de neutrófilos de los ratones infectados con *BbΔbvgR* (barra verde) disminuyeron hasta alcanzar el nivel de los ratones control y se mantuvieron indistinguibles de éstos durante los siguientes tiempos

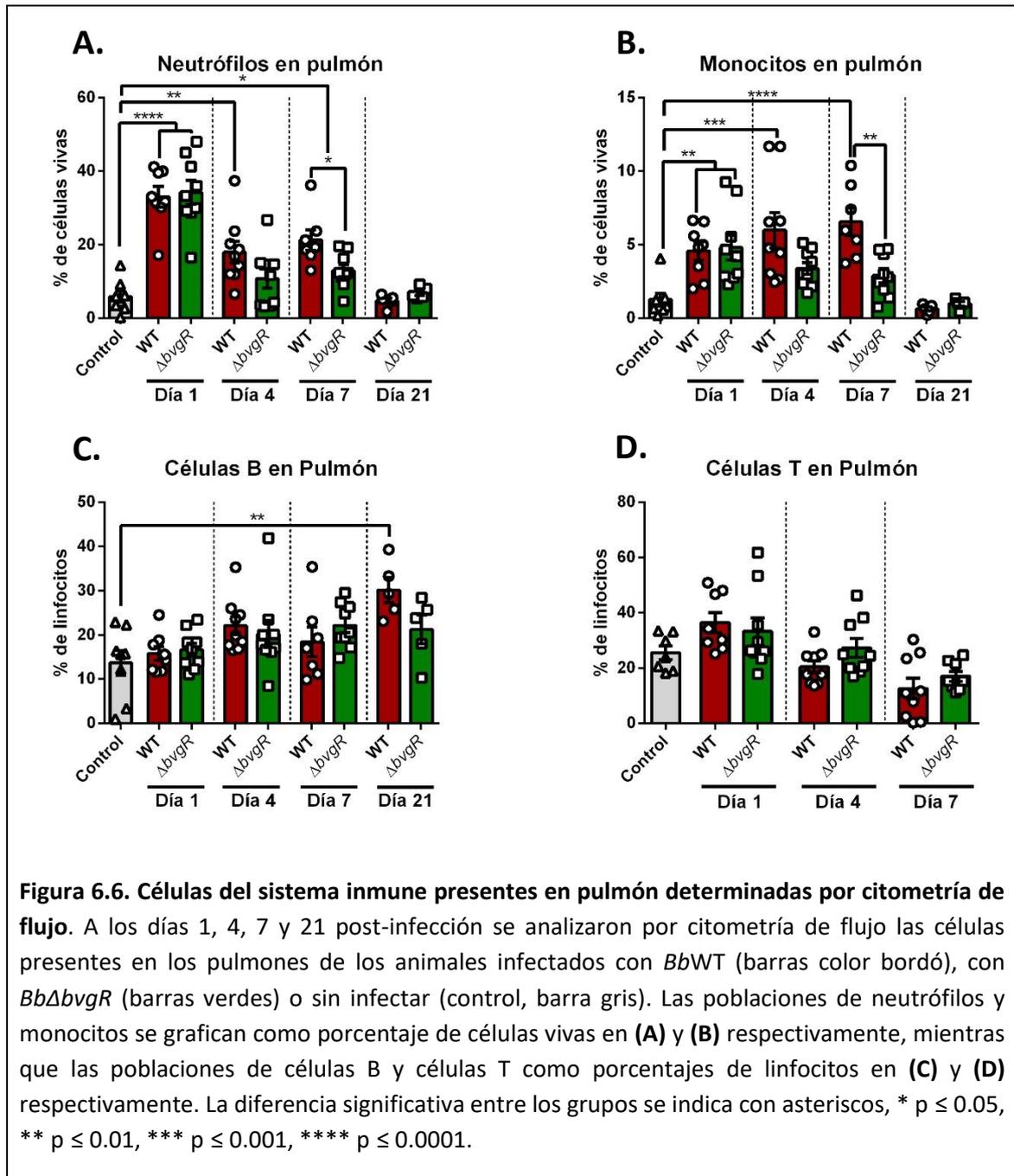
analizados. Por otro lado, las muestras de sangre de los ratones infectados con *Bb*WT (barra bordó) presentaron valores de neutrófilos similares a las de los ratones sin infectar a los días 4 y 21 post-infección, aunque en el día 7 post-infección estos valores resultaron ser significativamente mayores a los de los ratones sin infectar. Estos resultados globalmente están en concordancia con los valores observados anteriormente con el método Hemavet. Con respecto al resto de las poblaciones, no hubo diferencias significativas entre los tres grupos en las poblaciones de monocitos, células B y células T en ninguno de los tiempos analizados (paneles B, C y D, respectivamente).



Análisis de las muestras de pulmón

Las muestras de pulmón mostraron patrones similares en los valores de neutrófilos y monocitos presentes en ellas, tal como se muestra en los paneles A y B de la Figura 6.6. En el primer día tras la inoculación se vio un aumento significativo de ambas poblaciones celulares en las muestras provenientes de ratones infectados tanto con *BbWT* (barra bordó) como con *BbΔbvgR* (barra verde) en comparación con las del grupo control (en gris). En el día 4 post-infección, los valores correspondientes a ambas poblaciones celulares de los ratones infectados con *BbΔbvgR* (barra bordó) disminuyeron hasta alcanzar los valores del grupo control (barra gris), mientras que los de los ratones infectados con *BbWT* (barra verde) se mantuvieron significativamente mayores que los del grupo control. En el día 7 post-infección, las poblaciones de neutrófilos y monocitos de los ratones infectados por *BbWT* (barra bordó) resultaron mayores que en las muestras de ratones infectados con *BbΔbvgR* o sin infectar (barras verde y gris respectivamente), mientras que la población de neutrófilos (pero no de monocitos) de los ratones infectados con *BbΔbvgR* resultó ser mayor que la de los ratones sin infectar. Para el día 21 post-infección, los valores de las poblaciones de monocitos y neutrófilos de los ratones infectados disminuyeron al nivel de los ratones control.

Por su parte, las células B presentaron únicamente un aumento en el día 21 en las muestras de pulmón de los ratones infectados con *BbWT* con respecto a los pulmones de los ratones control (Figura 6.6, panel C). Los niveles de células T (panel D) no mostraron diferencias significativas entre los pulmones provenientes de ratones infectados y sin infectar en ninguno de los tiempos analizados.



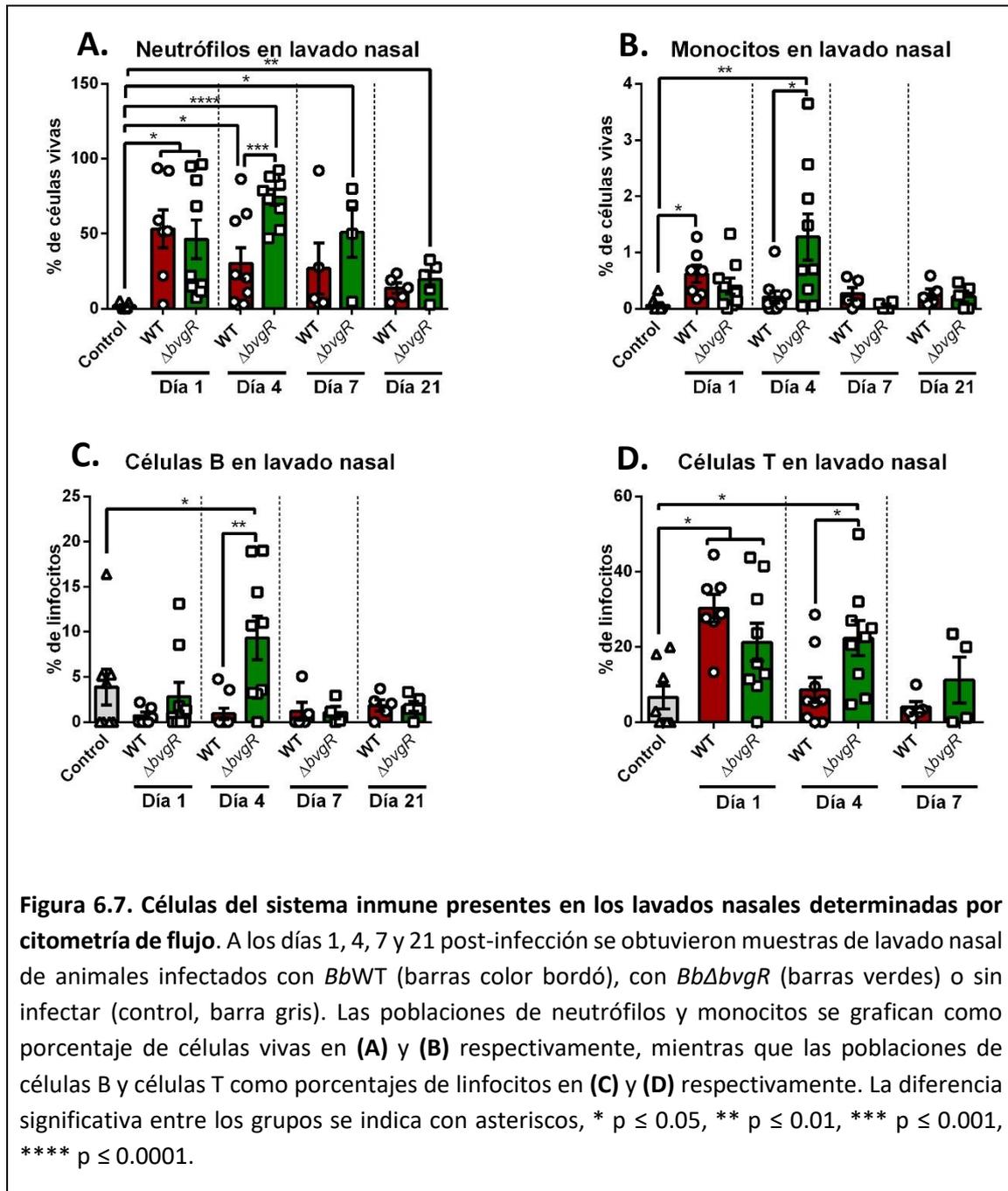
Análisis de las muestras de lavado nasal

Por último, los resultados de la citometría de flujo sobre las muestras de lavados nasales se presentan en la Figura 6.7. Cuando se analizaron los datos provenientes de los lavados nasales se observó un fuerte incremento en el número de neutrófilos en el primer día tras la inoculación en aquellas muestras provenientes de ratones, como se observa en el panel A de la figura. En el día 4 post-infección, el nivel de neutrófilos en los lavados nasales de los ratones infectados tanto con *Bb*WT (barra bordó) como con *Bb* $\Delta bvgr$ (barra verde) fue mayor que el de los ratones sin

infectar (barra gris). No obstante, en ese mismo tiempo los ratones infectados con *BbΔbvgR* además presentaron un nivel significativamente mayor de neutrófilos en nariz que los ratones infectados por *BbWT*. Finalmente, a los días 7 y 21 post-infección los valores de neutrófilos presentes en los lavados nasales de ratones infectados con *BbWT* resultaron ser indistinguibles del control. En estos tiempos los valores encontrados en los ratones infectados con *BbΔbvgR* fueron significativamente mayores a los de los ratones control.

Con respecto a la población de monocitos en las muestras de lavado nasal, los ratones *BbWT* (barra bordó) presentaron un nivel significativamente mayor que los ratones sin infectar tras 24 horas de infección (Figura 6.7, panel B). Al día 4 post-infección los ratones *BbΔbvgR* (barra verde) mostraron valores más altos de monocitos que los ratones infectados con *BbWT* y los ratones control. Luego, a los días 7 y 21 post-infección, los tres grupos presentaron valores similares.

Al analizar las poblaciones linfocitarias se vio un aumento en los valores de células T en el primer día de infección en las muestras de los ratones infectados con *BbWT* y *BbΔbvgR* (barra bordó y verde respectivamente en Figura 6.7, panel D) en comparación con los ratones sin infectar (barra gris), pero en el día 4 post-infección, el valor de los ratones infectados con *BbWT* disminuyeron al nivel de los ratones control mientras los valores de los ratones infectados con *BbΔbvgR* resultaron significativamente mayores que los de los ratones infectados con *BbWT* y sin infectar. Con respecto a la población de células B (Figura 6.7, panel C), los ratones infectados con *BbΔbvgR* también presentaron un aumento significativo en comparación con los otros dos grupos analizados en el día 4 post-infección.



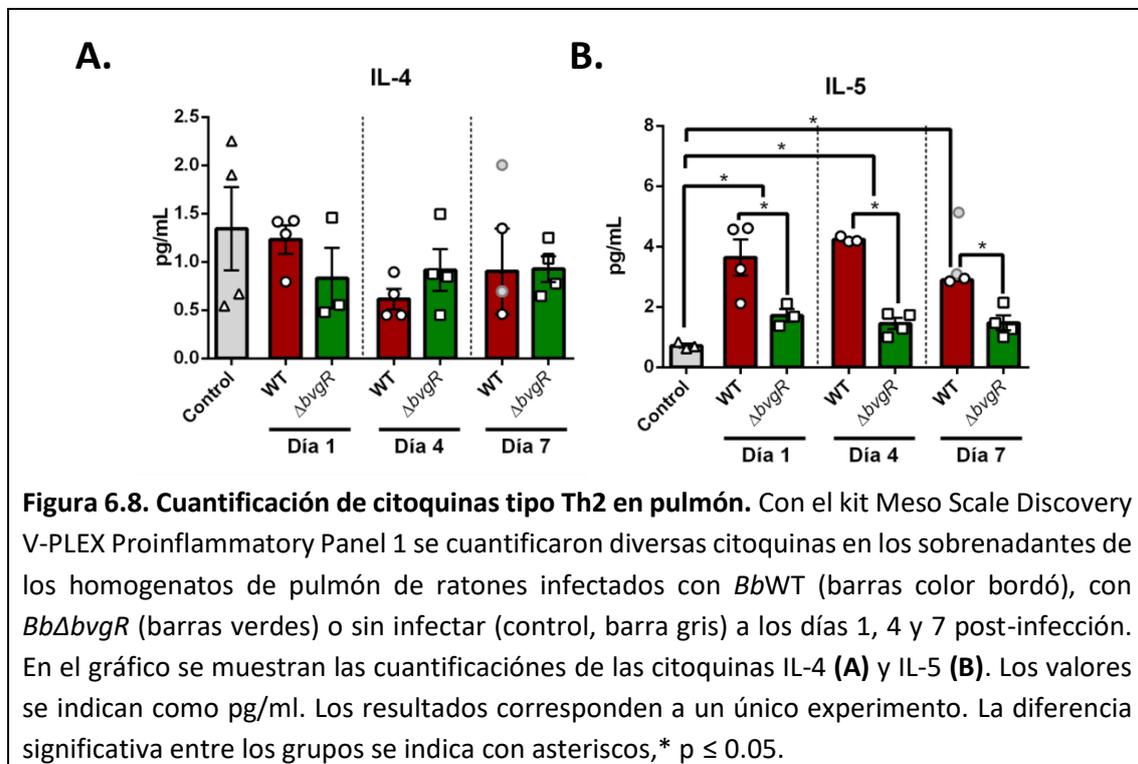
c. Respuesta inducida a nivel de citoquinas secretadas

El último enfoque utilizado para evaluar la respuesta inmune frente a la infección por parte de *Bb*WT y *Bb* $\Delta bvgR$ fue la cuantificación de citoquinas presentes en los sobrenadantes de los homogenatos de pulmón. Este tipo de ensayo se realizó únicamente sobre las muestras obtenidas a partir del primer ensayo de colonización, debido a la falta de disponibilidad de los kits utilizados. Estos kits (MSD Proinflammatory Panel 1 Mouse kit y MSD IL 17 kit) son capaces de detectar y cuantificar 11 citoquinas importantes para la respuesta inflamatoria y la regulación

del sistema inmune en diferentes tejidos. El kit “Proinflammatory Panel 1 Mouse” detecta IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, KC/GRO (CXCL1), IL-10, IL-12p70 y TNF- α , mientras que el kit MSD IL-17 detecta IL-17A de ratón.

La respuesta inmune del huésped frente a la infección con *Bordetella* se caracteriza por ser una respuesta fuertemente inflamatoria, con la presencia de citoquinas como IFN- γ , IL-6, IL-1 β y TNF- α que llevan a la infiltración de neutrófilos, células dendríticas, macrófagos y linfocitos. De esta manera, la respuesta inmune se caracteriza por un perfil tipo Th1/Th17 y no Th2. A su vez, *Bordetella* estimula la producción de IL-10, induciendo la generación de células T regulatorias y promoviendo la persistencia de la bacteria (revisado en (Higgs *et al.*, 2012)).

En este sentido, la principal interleuquina que estimula la diferenciación de células T a un perfil Th2, IL-4, no presentó diferencias entre los tres grupos en los distintos tiempos analizados (Figura 6.8, panel A). Otra citoquina asociada al perfil Th2, IL-5, también presentó en los animales infectados cantidades significativamente mayores a los presentes en los ratones control (Figura 6.8, panel B). Sin embargo, la cantidad de IL-5 detectada en los pulmones de los ratones infectados con *Bb*WT fue mayor que la detectada en los ratones infectados con *Bb* Δ *bvgR* en todos los tiempos analizados.



En los paneles A, B, C, D de la Figura 6.9 se pueden ver los resultados de las citoquinas que promueven una respuesta tipo Th1. En rasgos generales, se observó un mayor nivel de estas citoquinas inflamatorias en los ratones infectados con la cepa *wild type* que en los infectados con *BbΔbvgR* o sin infectar. Destacamos entre las citoquinas tipo Th1 analizadas el caso de TNF- α . El nivel de TNF- α detectado presentó un aumento en los ratones infectados con respecto a los ratones control en el día 1. En los días siguientes, el nivel de TNF- α de los ratones infectados con *BbΔbvgR* disminuyó hasta el nivel de los ratones sin infectar. Por el contrario, el nivel de TNF- α de los ratones infectados con *BbWT* fueron significativamente mayores que los dos grupos a los días 4 y 7 post-infección, cerca de 70 y 65 veces el valor de los ratones control respectivamente (panel D).

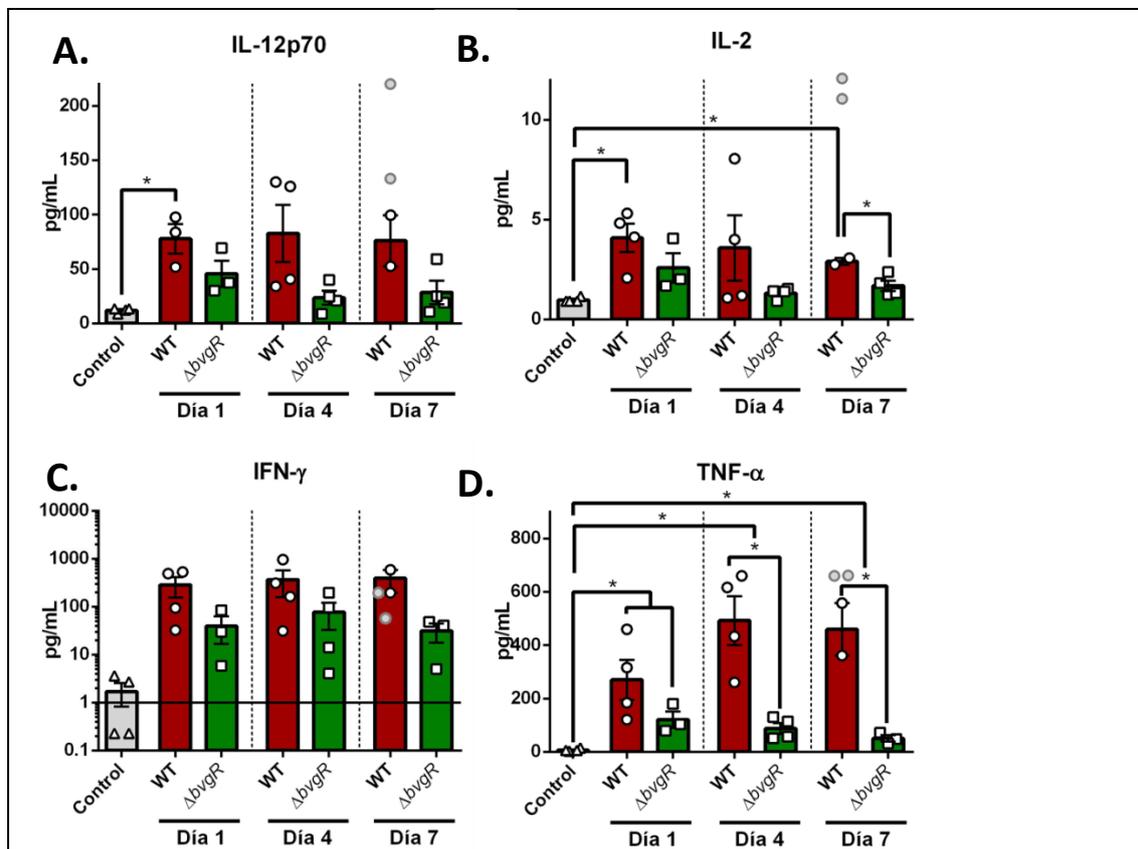
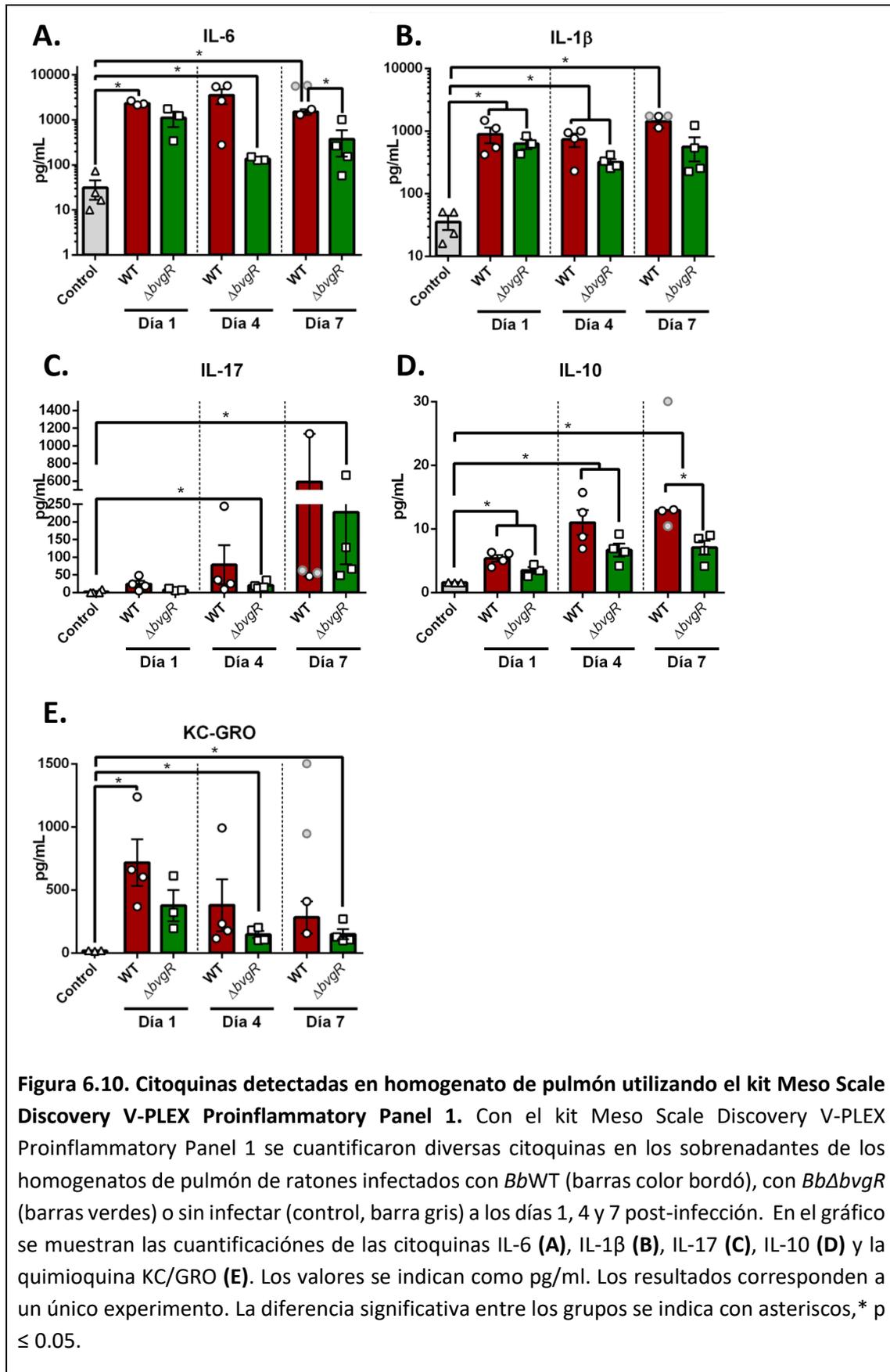


Figura 6.9. Cuantificación de citoquinas tipo Th1 en pulmón. Con el kit Meso Scale Discovery V-PLEX Proinflammatory Panel 1 se cuantificaron diversas citoquinas en los sobrenadantes de los homogenatos de pulmón de ratones infectados con *BbWT* (barras color bordó), con *BbΔbvgR* (barras verdes) o sin infectar (control, barra gris) a los días 1, 4 y 7 post-infección. En el gráfico se muestran las cuantificaciones de las citoquinas IL-12p70 (A), IL-2 (B), INF- γ (C) y TNF- α (D). Los valores se indican como pg/ml. Los resultados corresponden a un único experimento. La diferencia significativa entre los grupos se indica con asteriscos, * $p \leq 0.05$.

Por otro lado, la respuesta inflamatoria tipo Th17 está estimulada por IL-6, IL-1 β e IL-23, y a su vez, las células Th17 secretan IL-17. Los ratones infectados con *BbWT* presentaron un drástico aumento de IL-6 con valores 102 veces más altos que el control en el día 1 post-infección y se mantuvo en esos valores en todos los puntos analizados (Figura 6.10, panel A). En el caso de los ratones infectados con *Bb Δ bvgR* únicamente se vio un aumento en el nivel de IL-6 en el día 4 con respecto a los ratones control (Figura 6.10, panel A) y siempre se mantuvo por debajo de los valores de los ratones infectados con la cepa *wild type*. Por su parte, los niveles de IL-1 β de los ratones infectados con *BbWT* y *Bb Δ bvgR* fueron significativamente mayores que el nivel de los ratones sin infectar a los días 1 y 4, mientras que al día 7 únicamente los ratones infectados con *BbWT* presentaron un aumento de IL-1 β comparados con los ratones sin infectar (panel B). En el panel C se puede ver que el nivel de IL-17 los ratones infectados con *Bb Δ bvgR* resultó mayor que en el control únicamente en los días 4 y 7.

Como se mencionó, la infección con *Bordetella* también estimula la producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10. Efectivamente, los niveles de IL-10 se vieron incrementados en los ratones infectados con *BbWT* y *Bb Δ bvgR* con respecto al control en todos los días analizados. En el día 7, los valores de IL-10 en los pulmones de los ratones infectados con *BbWT* resultaron además mayores que los de aquellos infectados con *Bb Δ bvgR* (Figura 6.10, panel D).

Por último, en el panel E de la Figura 6.10 se presentan los resultados de la única quimioquina detectada por el kit, KC/GRO. KC/GRO, también conocida como CXCL1, media el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección. El nivel de KC/GRO se encontró elevado con respecto al control en los ratones infectados por *BbWT* en el día 1 y en los ratones infectados por *Bb Δ bvgR* en los días 4 y 7.



Conclusiones

En este capítulo se presentaron los resultados del modelo de infección intranasal en ratones que empleamos con el objetivo de estudiar el rol de BvgR durante el proceso infeccioso de *B. bronchiseptica*. Esta serie de ensayos nos permitió profundizar nuestro conocimiento sobre el mutante $\Delta bvgR$ como patógeno, su interacción con el huésped y los mecanismos inmunológicos que desencadena durante su infección. Nuestro enfoque constó en infectar ratones por vía intranasal con una cepa de *B. bronchiseptica* WT o una deficiente en *bvgR* y evaluar a lo largo de 21 días tanto la colonización en el tracto respiratorio como la respuesta inmune inducida en la cavidad nasal, en los pulmones y en sangre.

Los resultados obtenidos indican que la cepa *Bb Δ bvgR* no es capaz de persistir en el tracto respiratorio bajo de manera tan eficiente como la cepa *BbWT*, ya que el nivel de colonización en pulmón y en tráquea fue significativamente menor. No obstante, la cepa *Bb Δ bvgR* colonizó y persistió en la cavidad nasal de los ratones de forma indistinguible de la cepa *wild type*. Este hallazgo está en concordancia con los resultados publicados por Martínez de Tejada y colaboradores (Martínez de Tejada *et al.*, 1998a). Ellos reportaron una disminución en la cantidad de bacterias recuperadas del pulmón y de la tráquea de ratones infectados con una cepa de *B. pertussis* deficiente en *bvgR* en comparación a la cepa *wild type* en el día 11 post-infección, cuando los niveles de colonización en la nariz no presentaron una diferencia significativa.

Resulta muy interesante la cantidad de bacterias recuperadas de la cavidad nasal al día 21 post-infección en la cepa *BbWT*. Se observa que mientras en el pulmón se recuperó alrededor de 2×10^3 UFC/ml, el recuento en los lavados nasales y en el tejido linfoide asociado a nasofaringe fue en el orden de 10^3 y 10^4 UFC/ml respectivamente. Esto implica que cuando los niveles de colonización en pulmón y tráquea disminuyeron durante el transcurso de la infección, el nivel de colonización en la cavidad nasal determinado por recuento bacteriano en los lavados nasales se mantuvo en el orden de 10^3 UFC/ml por lo menos hasta el día 21 post-infección. En este sentido, la diferencia entre lo que sucede en el pulmón y la cavidad nasal de un ratón infectado por *Bb Δ bvgR* es más marcada, ya que tras 21 días de infección el número de bacterias en el pulmón está debajo del límite de detección mientras que en la cavidad nasal presenta 10^3 UFC/ml.

En lo que respecta a la respuesta celular inducida por las cepas analizadas se observó que los ratones infectados con la cepa *wild type*, pero no los infectados con *Bb Δ bvgR*, presentaron

un leve pero significativo aumento en la cantidad de glóbulos blancos en sangre con respecto a los ratones sin infectar en los días 4 y 7 post-infección. Asimismo, la sangre de los ratones infectados con *BbWT* mostró un mayor nivel de neutrófilos que la de aquellos ratones infectados con *BbΔbvgR* en los días 4 y 7 post-infección.

A nivel de pulmón se pudo evidenciar que hubo un mayor reclutamiento de células del sistema inmune en los ratones infectados con la cepa *BbWT* que en los infectados con *BbΔbvgR*, principalmente de las poblaciones de neutrófilos y monocitos tras siete días de infección. Este aumento no pudo ser explicado en base a las diferencias cuantificadas de citoquinas involucradas en este proceso como KC-GRO (Figura 6.10). Esto pudo deberse a la poca sensibilidad del método para determinar dicha citoquina o a que otras citoquinas no cuantificadas estén involucradas en el reclutamiento.

A diferencia de lo observado en el pulmón, en la cavidad nasal de los ratones infectados con *BbΔbvgR* hubo un mayor reclutamiento de todas las poblaciones celulares analizadas en el día 4 post-infección. Esto resulta interesante porque es en esta región del sistema respiratorio en donde el mutante *BbΔbvgR* fue capaz de persistir en todos los tiempos analizados.

Como parte del estudio de la respuesta inmune desencadenada frente a la infección con *BbWT* y *BbΔbvgR* se cuantificó la concentración de citoquinas en los sobrenadantes de los homogenatos de pulmón. *B. bronchiseptica* se caracteriza por promover una respuesta inmunitaria tipo Th1/Th17, pero no una fuerte respuesta Th2. En este sentido, al analizar las citoquinas tipo Th2 se vio que los ratones infectados no presentaron un aumento en los niveles de IL-4 respecto a los ratones control, aunque sí un ligero pero significativo aumento en los niveles de IL-5.

Al analizar citoquinas tipo Th1, como IL-2, IL-12, IFN- γ y TNF- α , se observó un importante incremento en el nivel de TNF- α en los ratones infectados con *BbWT* con respecto a los otros dos grupos de ratones. Existe evidencia de que la producción de TNF- α en estadios tempranos de la infección con *B. bronchiseptica* es un factor determinante para que ésta se resuelva de manera eficiente (Paul B Mann *et al.*, 2004). Es precisamente en los niveles de TNF- α en donde se observaron las diferencias más llamativas entre los ratones infectados por ambas cepas. Los ratones infectados con *BbΔbvgR* mostraron niveles más bajos de TNF- α (entre 2 y 5 veces menores) que los ratones infectados con la cepa *wild type* a lo largo todo el experimento.

En lo que respecta a las citoquinas asociadas a un perfil Th17, los ratones infectados presentaron niveles elevados de IL-6, IL-1 β e IL-17 en comparación a los ratones control, y en el

caso de IL-6, estos niveles fueron más altos en los ratones infectados con *BbWT* que en los infectados por *BbΔbvgR* al día 7 post-infección. Dado que la ACT es uno de los principales factores de *Bordetella* que estimula la síntesis de las citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-1 β e IL-17, este resultado podría deberse a diferencias en la cantidad y en el perfil de localización de la proteína ACT entre *BbWT* y *BbΔbvgR*. Sin embargo, estas cepas no presentan diferencias en los niveles de expresión de ACT, por lo que la diferencia en el perfil inflamatorio podría estar relacionado con diferencias en la localización de ACT en las bacterias (ver capítulo 2 y capítulo 4). (Ross *et al.*, 2004; Dunne *et al.*, 2010).

Por último, los pulmones de los ratones infectados presentaron un aumento en los niveles de la citoquina antiinflamatoria IL-10 respecto a los ratones sin infectar, y en el día 7 post-infección los niveles detectados en los ratones infectados con *BbWT* fueron mayores a los detectados en los ratones infectados con *BbΔbvgR*. Este dato puede relacionarse con la menor actividad del SST3 que presenta la cepa *BbΔbvgR* respecto a la cepa *wild type* ya que el SST3 de *B. bronchiseptica* induce la producción de IL-10 (Nagamatsu *et al.*, 2009). Más aun, el SST3 actúa en conjunto con la ACT modulando a las células dendríticas hacia un estado semi-maduro lo cual promueve una respuesta inmune tolerogénica (Skinner *et al.*, 2004).

Resulta llamativo que la respuesta inmune inducida por la cepa *wild type* durante los primeros 7 días de infección fue más robusta que la inducida por el mutante *BbΔbvgR*, aunque el nivel de colonización en ese período fue similar. Esto nos genera varias preguntas: ¿por qué la cepa *wild type* sobrevivió tan eficientemente como la cepa *BbΔbvgR* cuando los ratones infectados con *BbWT* reclutaron un mayor número de neutrófilos y macrófagos al pulmón y éstos presentaron niveles de TNF- α e IL-6 mayores? ¿por qué la mutante *BbΔbvgR* no fue capaz de proliferar en mayor proporción en el tracto respiratorio del ratón si la respuesta inmune que indujo fue más leve? ¿Por qué los ratones infectados con *BbΔbvgR* no presentaron una respuesta inmune más fuerte si llevaban una alta carga bacteriana?

Una posibilidad es que la cepa *BbΔbvgR* sea más susceptible que la cepa *BbWT* y que la respuesta inmune que induce sea suficiente para controlar su proliferación. Otra posibilidad es que en los ratones infectados con la cepa *wild type* las células del sistema inmune reclutadas al sitio de infección se encuentren menos activadas que las reclutadas en los ratones infectados por *BbΔbvgR* y que, por ello, frente a un mayor reclutamiento celular *BbWT* pueda mantener un alto nivel de colonización. Esto podría ser producto de una mejor modulación de la respuesta inmune por parte de *BbWT*, mediada por ACT y SST3. Una última opción es que la cepa *BbΔbvgR* sea igual de susceptible que la cepa *wild type* y que las células del sistema inmune de los ratones

infectados con estas cepas presenten el mismo nivel de activación pero que la cepa *BbΔbvgR* sea reconocida en menor medida por el huésped. Esto podría ser el resultado de que la cepa *BbΔbvgR*, que en condiciones de virulencia forma más biofilm que la cepa *wild type* y se establezca en el sitio de infección formando biofilm. El fenómeno de una menor inducción del sistema inmune por parte de células derivadas de biofilm ya ha sido descrito (Guilhen *et al.*, 2019).

B. bronchiseptica sin el gen *bvgR* es capaz de sostener una infección en pulmón y tráquea, respecto al número de bacterias viables recuperadas, durante los primeros 7 días. Sin embargo, al día 21 post-infección el número de bacterias desciende significativamente. No obstante, la carga bacteriana en la cavidad nasal, determinada por recuento en el lavado nasal y en NALT, fue indistinguible entre las cepas *BbΔbvgR* y *BbWT* durante todo el ensayo. Este resultado se asemeja a lo que ocurre con cepas de *B. bronchiseptica* mutantes en el SST3 que son recuperadas en menor proporción que la cepa *wild type* en la tráquea a los 35 días de infección, pero en igual proporción en la muestra de origen nasal (Ming Huam *et al.*, 2000). Por otro lado, en un ensayo de infección con una cepa de *B. bronchiseptica* que expresa el flagelo de manera ectópica fueron recuperadas menos bacterias viables en tráquea a los 15 y 26 días post-infección respecto a la cepa *wild type* (Akerley, Cotter and Miller, 1995). Teniendo esto en cuenta, podría vincularse la menor aptitud de la cepa *BbΔbvgR* de persistir en tráquea en el día 21 post-infección debido a que expresa el flagelo en fase virulenta.

Por otro lado, si bien se observaron iguales cantidades de bacterias viables en la cavidad nasal de los animales infectados con *BbWT* y *BbΔbvgR* la respuesta del animal en esta zona no fue similar. A los 4 días post-infección llama la atención un mayor reclutamiento de neutrófilos, monocitos y linfocitos B a la cavidad nasal infectada con la cepa *BbΔbvgR*. Esto podría ser en respuesta a que la cepa *BbΔbvgR* es capaz de formar un biofilm más robusto que el de la cepa *BbWT* en la nariz. Este fenotipo también podría explicar que *BbΔbvgR* presente una capacidad de desprenderse disminuida y por lo tanto no pueda descender al pulmón. Se ha reportado que una cepa de *B. bronchiseptica* que no sintetiza el exopolisacárido Bps, requerido para la formación de biofilm, presenta dificultades para sobrevivir en este modelo (Nicholson *et al.*, 2017).

En conclusión, este ensayo *in vivo* nos permitió establecer que la proteína BvgR es un factor relevante durante el proceso infeccioso dado que su presencia es requerida para que la bacteria persista eficazmente en el tracto respiratorio bajo, probablemente regulando proteínas y procesos implicados durante la infección.

Conclusiones generales

Las clásicas *Bordetellas* son bacterias patógenas capaces de colonizar el tracto respiratorio de distintos mamíferos. La enfermedad respiratoria causada por ellas repercute en la sociedad de manera directa porque *B. pertussis* y *B. parapertussis* son los agentes causales de la tos convulsa, y de manera indirecta dado que *B. bronchiseptica* infecta animales domésticos y de consumo.

Históricamente, se propuso que la virulencia de *Bordetella* spp. estaba regulada principalmente por un sistema de dos componentes maestro, de manera tal que cuando el sistema estaba activo se expresaban aquellas proteínas requeridas para la virulencia de la bacteria y se reprimían las proteínas asociadas a la avirulencia, mientras que cuando el sistema estaba inactivo ocurría lo contrario. Este sistema de dos componentes, BvgAS, ha sido ampliamente estudiado y se compone por una proteína sensora, BvgS, y un regulador de respuesta, BvgA. BvgS se encuentra activo en las condiciones normales de crecimiento de la bacteria y fosforila a BvgA, pero cuando sensa determinadas señales se inactiva y cesa la fosforilación de BvgA. Aunque las señales que inactivan a BvgS *in vivo* no han sido identificadas hasta el momento, *in vitro* se puede modular su actividad agregando MgSO₄ o ácido nicotínico al cultivo o disminuyendo la temperatura de incubación. Numerosos estudios han demostrado que BvgA, tras ser fosforilado por BvgS, se une a la región promotora de los genes que se expresan específicamente en fase virulenta (*vags*). Cuando BvgS no fosforila a BvgA, los genes de fase virulenta activados por BvgA no se transcriben. Por mecanismos aún no descritos en su totalidad, a su vez se transcribe un conjunto de genes cuya expresión se encuentra reprimida en fase virulenta (*vrgs*). De acuerdo a este modelo se definieron tres fases fenotípicas: una fase virulenta (bvg+), una fase intermedia en la que se expresan algunos factores de virulencia y algunas proteínas propias de esta fase (bvg i) y una fase avirulenta (bvg -).

Ensayos de infección en distintos modelos animales han demostrado que la fase virulenta de *Bordetella* spp. es necesaria y suficiente para que se establezca la infección. Por este motivo, se ha procurado caracterizar en profundidad las proteínas que se expresan durante la fase virulenta de *Bordetella* spp., como aquellas adhesinas y toxinas relevantes para el proceso infeccioso y aquellas proteínas que forman parte de las formulaciones vacunales contra pertussis. Por el contrario, el conocimiento de las proteínas que se encuentran reprimidas durante la fase virulenta y que se expresan en la fase avirulenta es escaso. El estudio de la fase avirulenta ha resultado poco atractivo para la comunidad científica debido a que ésta no pareciera tener un rol relevante durante el proceso de infección. A pesar de la escasa evidencia disponible, se ha postulado que puede estar involucrada en la diseminación de la bacteria entre huéspedes. No obstante, es preciso destacar que la fase avirulenta es un rasgo conservado en

Bordetella spp., aún en *B. pertussis*, un patógeno que sólo ha sido aislado en infecciones en humanos. Se ha propuesto que *B. pertussis* cambia de fase virulenta a avirulenta cuando persiste de manera intracelular en macrófagos ya que en dicha situación se reduce la expresión de genes de virulencia (Petráčková *et al.*, 2020). En el caso de *B. bronchiseptica* ya ha sido descrito que una cepa bloqueada en fase avirulenta es capaz de sobrevivir dentro de la ameba *D. discoideum* y diseminarse con ella (Taylor-Mulneix *et al.*, 2017).

Actualmente, el modelo de BvgAS como regulador maestro principal se ha ido debilitando. El antiguo concepto de que este sistema actuaba como un interruptor tipo ON/OFF ha ido cambiando. En los últimos años se ha demostrado que el sistema BvgAS tiene matices, que no activa o reprime todos los genes con la misma intensidad, así como éstos no responden de manera idéntica a la modulación de BvgS por MgSO₄. Además, en los últimos 15 años se ha descrito la presencia de otros sistemas de dos componentes, así como otros sistemas de regulación. Todos operan en conjunto, dando una regulación mucho más específica y más fina (Gestal, Whitesides and Harvill, 2019).

Nuestro grupo de trabajo centró su línea de investigación en el estudio del segundo mensajero bacteriano c-di-GMP en las bacterias del género *Bordetella* y su importancia durante la interacción patógeno-huésped. Así como el c-di-GMP regula diversos fenotipos en una gran cantidad de especies bacterianas, hemos demostrado que el c-di-GMP regula la formación de biofilm, la movilidad y la virulencia en *B. bronchiseptica* (Sisti *et al.*, 2013; Ambrosis *et al.*, 2016; Belhart *et al.*, 2019). Como parte de estos estudios, hemos identificado DGCs y PDEs funcionales y hemos empezado a ahondar qué DGC y/o PDE regulan los distintos fenotipos afectados, con el objetivo de desenmarañar la red de c-di-GMP en esta bacteria.

En este contexto, focalicé mi estudio en BvgR, una proteína que ha sido relativamente poco caracterizada a pesar de ser interesante por diversos motivos. En primera instancia, es una proteína estrechamente relacionada con el sistema BvgAS y por otro lado, presenta un único dominio con características de fosfodiesterasa específica del segundo mensajero c-di-GMP, denominado dominio EAL. Por lo tanto, BvgR podría representar una vinculación directa entre dos sistemas de regulación de *Bordetella*. Adicionalmente, resulta curioso cómo se han establecido algunas generalizaciones en torno a BvgR sin suficiente evidencia experimental que las sustente. En las primeras publicaciones en las que se estudió BvgR se determinó que esta proteína es requerida para la represión de ciertos genes *vrgs* durante la fase virulenta de *B. pertussis*, así como para la inhibición de la movilidad mediada por flagelo en *B. bronchiseptica*, pero en los años siguientes no hubo avances sustanciales sobre qué otras proteínas regula. Más

aun, Stibitz y colaboradores han afirmado que BvgR afecta la expresión de genes de manera indirecta al degradar c-di-GMP pese a que no hay ensayos *in vitro* o *in vivo* que constaten dicha actividad (Chen *et al.*, 2017; Chen and Stibitz, 2019). Por lo tanto, desde los primeros reportes se ha considerado a BvgR estrictamente como una proteína que reprime factores de avirulencia, pero no se ha profundizado sobre qué proteínas regula ni cómo lo hace.

En la primera parte de este trabajo de Tesis se analizó si BvgR realmente podía presentar actividad fosfodiesterasa, a través de un análisis bioinformático. Este reveló en primer lugar que BvgR no presenta los aminoácidos descritos como importantes para una actividad fosfodiesterasa. Esta predicción nos llevó a preguntarnos: si no tiene actividad fosfodiesterasa ni dominio de unión a ADN, ¿cómo hace BvgR para regular la expresión génica? Entonces, formulamos la hipótesis de que BvgR ejercería su rol regulatorio interactuando con otra proteína y que su capacidad de interactuar dependía de los niveles intracelulares de c-di-GMP. Esto se debe a que el análisis bioinformático no nos permitió descartar que pueda unir c-di-GMP. Considerando que BvgR regula un fenotipo bien marcado en *B. bronchiseptica* (reprimiendo la movilidad) y que la mayor parte del trabajo de mi grupo de investigación se realiza en esta bacteria, todos los ensayos que llevé adelante fueron con la proteína BvgR de la cepa *B. bronchiseptica* 9.73H+.

Como una primera aproximación al tema en estudio hicimos diversos análisis bioinformáticos sobre la secuencia aminoacídica de BvgR. Tras corroborar cuán conservada se encuentra en distintas cepas de las tres clásicas *Bordetellas*, comparamos la secuencia de BvgR con una gran variedad de secuencias correspondientes a proteínas con dominio EAL. El hecho de que BvgR carezca del residuo de glutamato (E) que da origen al nombre del dominio y que es indispensable para la actividad fosfodiesterasa, así como de otros residuos involucrados en la unión al sustrato, al catión divalente y en el mecanismo de hidrólisis, sugiere convincentemente que esta proteína no presenta actividad fosfodiesterasa. Frente a la dificultad de evaluar actividad fosfodiesterasa *in vitro*, realizamos ensayos de movilidad en una cepa mutante en *bvgR* complementada con una fosfodiesterasa activa, BB2664. La incapacidad de BB2664 de revertir el fenotipo de *BbΔbvgR* a un fenotipo tipo *wild type* resulta otro indicio de que BvgR no posee actividad fosfodiesterasa.

Los dominios EAL pueden clasificarse en tres categorías de acuerdo a si poseen los residuos necesarios para la actividad enzimática y a si poseen conservado la secuencia del *loop* 6 requerido para la oligomerización. De esta manera, BvgR pertenece a la tercera clase de EAL, que engloba a aquellas sin actividad fosfodiesterasa y sin el *loop* 6 conservado. Algunas

proteínas de esta clase, como YdiV de *E. coli*, son capaces de interactuar con el regulador maestro del aparato flagelar FlhD, pero nuevamente, el alineamiento de secuencia indica que BvgR no cuenta con los aminoácidos requeridos para dicha interacción. Por lo tanto, BvgR es una proteína *stand-alone* EAL peculiar, que no comparte su particularidad con ninguna otra de las secuencias analizadas.

El análisis bioinformático también reveló que BvgR tiene regiones poco solubles y el modelado de su estructura exhibe una gran cantidad de residuos hidrofóbicos en la superficie de la proteína. En concordancia con los resultados *in silico*, pudimos purificar a BvgR a partir de un cultivo de *B. bronchiseptica* únicamente expresando a la proteína desde un plásmido bajo el control de un promotor fuerte y fusionada al dominio solubilizador MBP. Incluso en dichas condiciones la cantidad de proteína recuperada no era abundante, lo cual imposibilitó nuestro objetivo de cristalizar la proteína para luego contar con mejores herramientas para determinar el mecanismo por el que BvgR podría ejercer su función. A pesar de no haber logrado purificar BvgR en el inicio de mi Tesis, sino más adelante y con ayuda de un grupo colaborador, vale la pena remarcar que conservamos las construcciones, el protocolo y la experiencia para poder plantear futuros experimentos con la proteína BvgR-MBP purificada. Con los respectivos controles, podríamos analizar si la proteína tiene actividad fosfodiesterasa *in vitro* o si puede unir o no c-di-GMP. De la misma manera, podríamos plantear ensayos de co-purificación para detectar qué proteínas interactúan con BvgR.

La aparente poca solubilidad de BvgR y la dificultad para purificarla apoya nuestra hipótesis de que BvgR interactúa con una o más proteínas y que gracias a éstas permanece soluble. Esta conjetura está respaldada por la presencia de aminoácidos hidrofóbicos en la superficie de la proteína y por el hecho de que, cuando se encuentra fusionada al dominio MBP, presenta una mayor actividad represora del fenotipo de movilidad.

Resulta difícil estimar qué proteínas podrían interactuar con BvgR, así como la función que cumplen. Estas proteínas podrían encontrarse tanto en el citoplasma como en la membrana interna de la bacteria y su expresión podría ser constitutiva o estar regulada por algún tipo de señal. Existe la posibilidad de que BvgR se encuentre unida a una proteína que la “secuestre” y la mantenga soluble en el citoplasma o asociada a la membrana. Ante una determinada situación, que podría ser una variación en los niveles de c-di-GMP, BvgR podría desprenderse de esta proteína y unirse a otra que ejercerá una función específica. Teniendo en cuenta el conjunto de genes regulados por BvgR es posible que BvgR sea capaz de unirse a factores de transcripción o bien a proteínas que regulen la actividad de éstos. El concepto de que BvgR se encuentra en

condiciones normales asociada a una proteína podría dar explicación a por qué es tan difícil de purificar en *E. coli*: en ausencia de esta proteína, BvgR estaría mal plegada y sería degradada rápidamente.

Como ya mencioné, no pudimos contar con proteína purificada al inicio de mi investigación, pero sí contamos con un mutante en *B. bronchiseptica* con un plásmido interrumpiendo el gen *bvgR*, cuyo fenotipo más notorio era la capacidad de nadar en la fase virulenta de la bacteria. Frente a la dificultad de proseguir los experimentos planeados con la proteína purificada, cambiamos nuestro enfoque y decidimos determinar qué genes regulaba BvgR. Para ello, realizamos RNA-seq y comparamos los transcriptomas de la cepa *wild type* y el mutante insercional en *bvgR*.

En línea con el rol represor que siempre se adjudicó a BvgR encontramos numerosos genes con mayor expresión en el mutante que en la cepa *wild type*, muchos de ellos relacionados con la movilidad bacteriana. Resultó interesante encontrar genes relacionados con el metabolismo de c-di-GMP sobreexpresados en el mutante: DGCs, PDEs y efectores. Esto implica que el sistema BvgAS regula la expresión de dichas proteínas a través de BvgR y regula, parcial e indirectamente, los niveles de c-di-GMP. Más allá de que algunos autores le atribuyeron a BvgR una actividad fosfodiesterasa, éste es el primer indicio de que BvgR podría regular niveles de c-di-GMP modificando la expresión de proteínas que sintetizan, degradan o unen a este segundo mensajero. Más aun, resultó interesante que la mitad de los genes con expresión disminuida en *BbbvgR* también se encontraron disminuidos en un ensayo transcriptómico en una cepa de *B. bronchiseptica* con altos niveles de c-di-GMP. Por otro lado, considerando la gran cantidad de factores de transcripción y chaperonas que se encontraron diferencialmente expresadas entre las cepas en este estudio, puede asumirse que BvgR ejerce parte de su rol regulatorio a través de este tipo de proteínas.

Al analizar el patrón de expresión de genes regulados por BvgR encontramos genes menos expresados en el mutante que en la cepa *wild type*, lo cual implica que BvgR regula positivamente dichos genes. Si bien se ha descrito en diferentes análisis ómicos este tipo de comportamiento, fue sorprendente para nosotros encontrar genes pertenecientes al locus *bsc* del SST3. Este sistema ha sido descrito y caracterizado como un factor de virulencia en las *Bordetellas* clásicas. Por lo tanto, en este trabajo identificamos por primera vez que BvgR es capaz de estimular la expresión de genes entre los cuales se incluyen factores de virulencia, además de cumplir con el rol represor de factores de avirulencia.

Como suele ocurrir luego de un ensayo de secuenciamiento masivo de ARN se abre un abanico de posibles cuestiones a estudiar. Por ello, nos focalizamos en tres temas que nos resultaron interesantes. En primer lugar nos preguntamos si dado que un aumento en los niveles de c-di-GMP correlaciona con una disminución en la movilidad en *B. bronchiseptica*, ¿BvgR reprimirá la movilidad de *B. bronchiseptica* disminuyendo la expresión de una fosfodiesterasa? En segundo lugar nos planteamos si considerando que tanto el c-di-GMP como el sistema Lap de *Bordetella* y el flagelo juegan un rol importante en la formación de biofilm, BvgR estará implicado en la regulación de este fenotipo. Por último, nos preguntamos: ¿qué repercusiones tiene en un modelo *in vitro* en células e *in vivo* la regulación de BvgR sobre el SST3?

En orden de responder nuestra primera pregunta, deletamos de la mutante *BbΔbvgR* los genes de las dos PDEs que se encontraban sobreexpresadas en dicha cepa de acuerdo a la RNA-seq y evaluamos su capacidad de nado en agar blando. Observamos que tanto las dobles mutantes como la triple mutante presentaron la misma capacidad de nado que la mutante *BbΔbvgR*, por lo que descartamos que estas PDEs sean las responsables de la represión que ejerce BvgR sobre la movilidad de *B. bronchiseptica*.

Con respecto a la segunda pregunta hicimos diversos ensayos de formación de biofilm en pocillos y observamos que, efectivamente, BvgR regula este proceso. La ausencia de esta proteína provoca un aumento en la formación de biofilm por parte de *B. bronchiseptica*. Más aun, pudimos identificar que el flagelo cumple un rol clave en la formación de biofilm del mutante *BbΔbvgR*, probablemente en la primera etapa del proceso. Además, dado que la ACT es menos secretada al medio extracelular por la cepa mutante *BbΔbvgR*, podría cumplir un rol secundario en la formación de biofilm de la cepa *wild type*, inhibiendo el crecimiento desmedido del biofilm ya establecido. Considerando que BvgR regula negativamente la formación de biofilm y la expresión de DGCs, y que además altos niveles de c-di-GMP promueven la formación de biofilm, podría plantearse en un futuro la posibilidad de determinar si dichas DGC están involucradas en la regulación de la formación de biofilm. En particular, la probable DGC BB2790 resulta de interés, dado que la expresión del gen *bb2790* desde un plásmido con un promotor fuerte en *B. bronchiseptica* promueve la formación de biofilm (resultados no publicados, Lic. F. Zacca).

Para abordar la tercera y última pregunta se realizaron ensayos *in vitro* en una línea de macrófagos murinos J774.A y un ensayo de infección por vía intranasal en un modelo murino con las cepas *BbWT* y *BbΔbvgR*. Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* revelaron que la cepa *BbΔbvgR* es menos citotóxica que la cepa *wild type*, lo que correlaciona con la menor expresión

y síntesis de proteínas del SST3 que presenta el mutante *BbΔbvgR*. Datos obtenidos por nuestro grupo de trabajo indican que altos niveles de c-di-GMP inhiben la expresión del SST3 y su actividad (Manuscrito en preparación), por lo que queda pendiente evaluar si las PDEs sobreexpresadas en el mutante *BbΔbvgR* están vinculadas con la regulación de este fenotipo en el mutante. Para ello planteamos hacer un *Western blot* para detectar Bsp22 en el sobrenadante de las dobles mutantes y en la triple mutante (*BbΔbvgR Δbb3128 Δbb1564*).

Es de esperar que BvgR interactúe con los sistemas que regulan al SST3 conocidos hasta el momento. En particular, BvgR comparte con BtrS la regulación de los mismos genes del locus *bsc*, involucrados en el proceso de secreción del SST3. Ambas proteínas son reguladores positivos de la expresión del locus *bsc*, pero no regulan entre sí su expresión, indicando que probablemente respondan a sistemas diferentes. Gestal y colaboradores describieron que la delección de *btrS* en *B. bronchiseptica* disminuye de forma significativa la persistencia de la bacteria en todo el tracto respiratorio, incluido nariz (Gestal, Whitesides and Harvill, 2019)

Los resultados del ensayo de infección en ratones nos revelaron que BvgR es importante durante este proceso y que su rol repercute a nivel de modulación de la respuesta inmune inducida y en la persistencia a largo plazo en el tracto respiratorio bajo. En particular, resultó interesante observar que *BbΔbvgR* persistió en la cavidad nasal durante todo el experimento, pero no pudo sostener la infección en los pulmones. Las bacterias presentes en el pulmón podrían provenir del inóculo inicial (20 µl es un volumen grande para las dimensiones del ratón) o de las bacterias ya establecidas en la nariz. Este diseño experimental no nos permitió diferenciar entre ambas opciones. Esquemas con bajos volúmenes de inóculo permitirían discernir entre ambas situaciones.

Aunque no se pueden descartar otras posibilidades, dos factores que potencialmente podrían relacionarse con este fenómeno es la disminución en la actividad del SST3 y la alta capacidad de formar biofilm que presenta el mutante *BbΔbvgR* respecto a la cepa *wild type*. Ambos factores son capaces de afectar la respuesta inmune del huésped y a su vez se ha reportado que cepas que no expresan SST3 activo o que presentan una disminución en la capacidad de formar biofilm son recuperadas en menor nivel que la cepa *wild type* en el tracto respiratorio bajo y a largo plazo (Ming Huam *et al.*, 2000; Conover *et al.*, 2012).

Respecto a la respuesta inmune generada por *BbΔbvgR* se observó que estimuló en menor medida la respuesta de TNF- α , IL-5, IL-6 e IL-10 a lo largo del ensayo. Así como el SST3 de *Bordetella* estimula la síntesis de IL-10, es probable que otras proteínas reguladas por BvgR estén involucradas en la inducción de la respuesta inflamatoria.

Recopilando todos los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis y teniendo en cuenta la bibliografía disponible del tema proponemos que:

- BvgR se encuentra asociada a una proteína en *B. bronchiseptica* que la mantiene soluble o asociada a la cara citosólica de la membrana interna, que le permite un correcto plegamiento y la protege de la degradación por proteasas. Luego, frente a una o más señales, BvgR se disocia de esta proteína e interactúa con otras proteínas en orden de cumplir su rol regulatorio. Una de estas señales podría ser la unión de c-di-GMP a BvgR, lo cual se condice con la superposición de los genes disminuídos en *BbbvgR*⁻ y en una cepa con altos niveles de c-di-GMP (Figura 7).

- La interacción de BvgR con otras proteínas, que podrían ser factores de transcripción o proteínas regulatorias, desencadena una serie de procesos que terminan en el rol regulatorio que se le adjudica a esta proteína. Aunque principalmente tenga un rol represor, como ocurre con el flagelo y con las proteínas del metabolismo de c-di-GMP, BvgR también estimula la expresión de genes como los del SST3 (Figura 7).

- La regulación de la expresión del SST3 por parte de BvgR impacta en la capacidad citotóxica de *B. bronchiseptica*.

- El abanico de genes regulados por BvgR determinan la represión de la movilidad por flagelo y la estimulación del SST3 y de la secreción de ACT al medio extracelular. BvgR inhibiría la formación de biofilm al regular la expresión del flagelo y la secreción de ACT. No obstante, la expresión de *bvgR* se ve disminuída en los primeros pasos de la formación de biofilm para que el flagelo pueda expresarse y mediar la adhesión. Su función sería evitar una formación de biofilm exacerbada en las primeras etapas de la infección.

- BvgR sería importante en dos momentos diferentes de la infección. Por un lado, al inicio de este proceso regulando factores que intervendrían a la hora de inducir la respuesta inmune característica de la cepa *wild type*. Entre éstos, se destacarían el SST3 y la formación de biofilm, aunque no puede descartarse que BvgR regule otros factores involucrados en este paso. En este sentido, factores regulados por BvgR estimularían la respuesta inmune en pulmón mientras que inhibirían el reclutamiento de neutrófilos y monocitos a la cavidad nasal. Por otro lado, una vez establecida la respuesta adaptativa (más allá de los 14 días post-infección) BvgR participaría en la persistencia de *B. bronchiseptica* en los pulmones de los animales infectados. Para ello, BvgR podría colaborar con la sobrevivencia de las bacterias en este nicho o bien, facilitando el descenso de las bacterias desde el tracto respiratorio superior al pulmón.

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis aportan a la comprensión del complejo conjunto de sistemas que regulan fenotipos en el género *Bordetella* y nos acercan un poco más a entender las diferentes formas de vida de este patógeno.

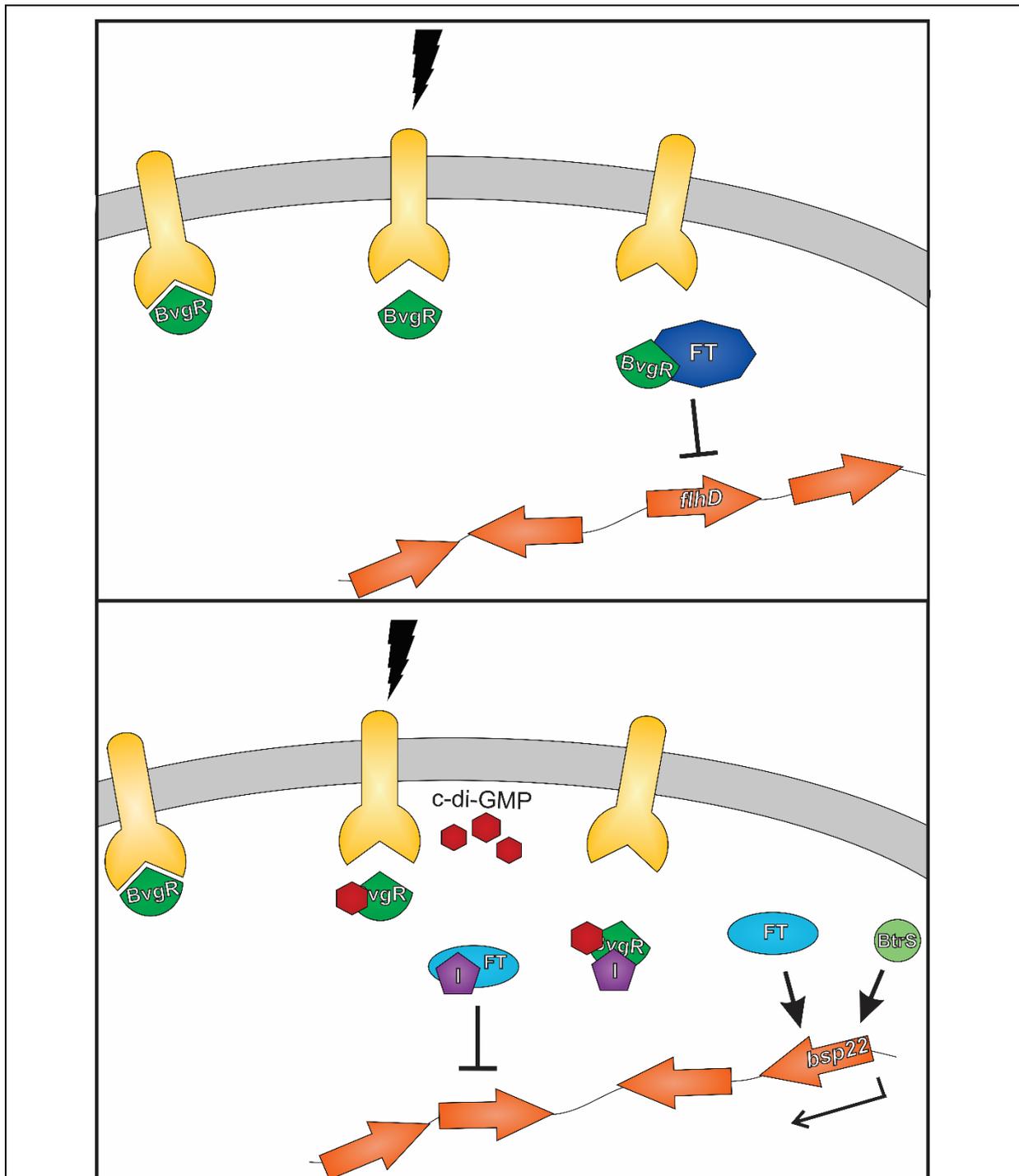


Figura 7. Modelo propuesto para el comportamiento de BvgR dentro de *B. bronchiseptica*. **A.** Posible modelo por el que BvgR reprimiría la expresión de un gen. BvgR se encontraría asociada a una proteína anclada a la membrana, que le permitiría su correcto plegamiento o evitaría su degradación. Frente a una señal BvgR se desprendería de esta proteína e interactuaría con un factor de transcripción (FT). Tras unirse a BvgR, este FT inhibiría la expresión génica (ejemplo: *flhD*). **B.** Posible modelo por el que BvgR estimularía la expresión génica. Frente a una señal, como podría ser c-di-GMP, BvgR dejaría de interactuar con la proteína de membrana. El c-di-GMP se uniría a BvgR y produciría un cambio conformacional en la proteína que le permitiría secuestrar a la proteína I. La proteína I es una proteína que inhibe la actividad del factor de transcripción FT. Al ser secuestrada la proteína I, FT estimula la expresión génica (ejemplo, *bsp22*).

Materiales y métodos

1. Técnicas microbiológicas

a. Cepas utilizadas

Las cepas utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla B.1.

Tabla B.1. Cepas utilizadas.

Cepa	Descripción	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
S17-1		(Simon, Priefer and Pühler, 1983)
DH5- α	recA, vlcU169, F80dlacZDM15	Bethesda Res. Lab.
E. cloni		Lucigen
BL21		
<i>Bordetella bronchiseptica</i>		
<i>Bb wild type</i>	<i>B. bronchiseptica</i> 9.73H+	(Le Blay <i>et al.</i> , 1997)
<i>BbbvgR</i> ⁻	<i>BbbvgR</i> ::pK18mob	Tesis doctoral Dra. Fernández (Fernandez, 2004).
<i>BbΔbvgR</i>	Delección limpia de <i>bvgR</i>	Este trabajo.
<i>BbΔbvgRΔBB3128</i>	Delección limpia de <i>BB3128</i> en <i>Bb ΔbvgR</i>	Este trabajo.
<i>BbΔBB3128</i>	Delección limpia de <i>BB3128</i>	Este trabajo.
<i>BbΔbvgRΔBB3128 ΔBB1564</i>	Delección limpia de <i>BB1564</i> en <i>Bb ΔbvgR ΔBB3128</i>	Este trabajo.
<i>BbΔBB1564</i>	Delección limpia de <i>BB1564</i>	Este trabajo.
<i>BbflaA</i> ⁻	<i>Bb flaA</i> ::pK18mob	Tesis doctoral Dra. Fernández (Fernandez, 2004)
<i>BbbvgR</i> ⁻ <i>flaA</i> ⁻	<i>BbbvgR</i> - <i>flaA</i> ::pG18mob	Tesis doctoral Dra. Fernández (Fernandez, 2004)
<i>BbΔbvgRflaA</i> ⁻	<i>BbΔbvgR flaA</i> ::pG18mob	Este trabajo
<i>BbΔbvgR</i> pBBR1-MCS 5 <i>pnptII</i>	<i>BbΔbvgR</i> con plásmido vacío	Este trabajo
<i>BbΔbvgR</i> pBBR1-MCS 5 <i>pnptII</i> <i>bvgR</i> -MBP x6His	<i>BbΔbvgR</i> con plásmido pBBR1-MCS 5 <i>pnptII</i> <i>bvgR</i> -MBP x6His	Este trabajo
<i>BbΔbvgR</i> pBBR1-MCS 5 <i>BvgR</i> _{tot}	<i>BbΔbvgR</i> que expresa <i>bvgR</i> bajo su propio promotor	Este trabajo
<i>BbΔbvgR</i> pBBR1-MCS 5	<i>BbΔbvgR</i> con plásmido pBBR1-MCS 5 vacío	Este trabajo

<i>BbΔbvgR</i> pBBR1-MCS 5 <i>pnptII</i> BB2664	<i>BbΔbvgR</i> que expresa <i>bb2664</i> bajo promotor <i>pnptII</i>	Este trabajo
<i>Bb</i> pGFLIP <i>pbvgA e2crimson</i>	<i>Bb</i> con plásmido pGFLIP <i>pbvgA e2crimson</i>	Este trabajo
<i>Bb ΔbvgR</i> pGFLIP <i>pbvgA e2crimson</i>	<i>BbΔbvgR</i> con plásmido pGFLIP <i>pbvgA e2crimson</i>	Este trabajo
<i>Bb</i> pGFLIP <i>pflaA e2crimson</i>	<i>Bb</i> con plásmido pGFLIP <i>pflaA e2crimson</i>	Este trabajo
<i>Bb ΔbvgR</i> pGFLIP <i>pflaA e2crimson</i>	<i>BbΔbvgR</i> con plásmido pGFLIP <i>pflaA e2crimson</i>	Este trabajo
<i>BbΔcyaA</i>	Mutante derivado de <i>Bb</i> con deleción limpia en <i>cyaA</i>	Nuestro laboratorio (sin publicar)
<i>Bb</i> RB53	Cepa bloqueada en fase virulenta derivada de <i>Bb</i> RB50. <i>bvgS-C3</i>	(Cotter and Miller, 1994)
<i>Bb</i> RB54	Cepa bloqueada en fase avirulenta derivada de <i>Bb</i> RB50. <i>bvgSΔ54</i>	(Cotter and Miller, 1994)
<i>Bb</i> RB53 pGFLIP <i>pbvgA e2crimson</i>	<i>Bb</i> RB53 con plásmido pGFLIP <i>pbvgA e2crimson</i>	Este trabajo
<i>Bb</i> RB54 pGFLIP <i>pbvgA e2crimson</i>	<i>Bb</i> RB54 con plásmido pGFLIP <i>pbvgA e2crimson</i>	Este trabajo
<i>Bb</i> RB53 pGFLIP <i>pflaA e2crimson</i>	<i>Bb</i> RB53 con plásmido pGFLIP <i>pflaA e2crimson</i>	Este trabajo
<i>Bb</i> RB54 pGFLIP <i>pflaA e2crimson</i>	<i>Bb</i> RB54 con plásmido pGFLIP <i>pflaA e2crimson</i>	Este trabajo
<i>Bb</i> RB515	Mutante derivado de <i>B. bronchiseptica</i> RB50 con deleción limpia de <i>cyaA</i>	(Henderson <i>et al.</i> , 2012)

b. Plásmidos utilizados

Los plásmidos utilizados durante este trabajo se detallan en la Tabla B.2.

Tabla B.2. Plásmidos utilizados.

Plásmido	Descripción	Referencia
pBBR1-MCS 5		(Kovach <i>et al.</i> , 1994)

pBBR1-MCS 5 <i>pnptII</i>	Vector pBBR1-MCS5 con promotor de <i>nptII</i> clonado corriente arriba del sitio de clonado múltiple.	(Sisti <i>et al.</i> , 2013)
pBBR1-MCS 5 <i>pnptII bvgR-MBP</i> 6His		Este trabajo
pBBR1-MCS 5 <i>pnptII BB3128</i>		Este trabajo
pBBR1-MCS 5 <i>pnptII BB26664</i>		Nuestro laboratorio (Manuscrito en preparación)
pGFLIP		(Byrd <i>et al.</i> , 2013)
pGFLIP p- <i>e2crimson</i>	pGFLIP que tiene clonado a <i>e2crimson</i> sin promotor	Este trabajo
pUC18T-mini-Tn7T-Gm- <i>e2crimson</i>		
pGFLIP <i>pbvgA e2crimson</i>	pGFLIP que expresa <i>e2crimson</i> bajo el promotor <i>pbvgA</i>	Este trabajo
pGFLIP <i>pflaA e2crimson</i>	pGFLIP que expresa <i>e2crimson</i> bajo el promotor <i>pflaA</i>	Este trabajo
pMQ30 <i>bvgRF1F2</i>	Construcción usada para delecionar <i>bvgR</i>	Este trabajo
pG18mob:: <i>flaA</i>		(Fernandez, 2004)
pMQ30 <i>BB3128F1F2</i>	Construcción usada para delecionar <i>bb3128</i>	Este trabajo
pMQ30 <i>BB1564F1F2</i>	Construcción usada para delecionar <i>bb1564</i>	Este trabajo
pMQ72- <i>bvgR6His</i>	Construcción para expresar <i>bvgR</i> con promotor sensible a arabinosa	Este trabajo
pET200- <i>bvgR6His</i>	Construcción para expresar <i>bvgR</i> con promotor sensible a IPTG	Este trabajo

c. Medios de cultivo y de conservación de los microorganismos

i. Medios y condiciones de cultivo

Todas las cepas de *B. bronchiseptica* utilizadas en este trabajo fueron aisladas a partir de un stock almacenado a -80°C en placas de Bordet Gengou (Difco) suplementadas con 10% v/v

sangre de carnero desfibrinada y estreptomina 200 µg/ml. El medio de cultivo líquido utilizado fue el medio sintético Stainer-Scholte (SS), suplementado con estreptomina 200 µg/ml. La incubación de los cultivos en medio sólido fue de 48-72 horas a 37°C, mientras que la de los de medio líquido fue con agitación (160 rpm), a 37°C y durante el tiempo indicado para cada ensayo.

Las cepas de *E. coli* fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (LB), en su forma líquida o sólida (15 % p/v agar), suplementadas con antibiótico cuando se requería.

ii. Medios de conservación

Las cepas utilizadas durante este trabajo fueron conservadas a largo plazo en su correspondiente medio líquido suplementado con glicerol estéril en una concentración final de 20% v/v y congeladas a -80°C.

iii. Antibióticos

Los medios de cultivo se suplementaron con antibióticos cuando fue necesario. Para ello se utilizaron soluciones concentradas de los antibióticos preparados en agua desionizada y filtradas.

Todas las cepas de *B. bronchiseptica* utilizadas en este trabajo son naturalmente resistentes a estreptomina, por lo que una concentración de 200 µg/ml fue utilizada para su crecimiento. Antibióticos como gentamicina y kanamicina fueron utilizados en aquellas cepas que llevaban un vector.

En la siguiente Tabla B.3 se detallan los antibióticos y concentraciones utilizadas.

Tabla B.3. Antibióticos usados para el cultivo de *B. bronchiseptica* y *E. coli*

Antibiótico	<i>B. bronchiseptica</i> (µg/ml)	<i>E. coli</i> (µg/ml)
Estreptomina (Str)	200	25
Gentamicina (Gm)	50	10
Kanamicina (Km)	80	50

2. Técnicas de biología molecular

a. Preparación de ADN plasmídico (miniprep)

Los plásmidos fueron obtenidos por la técnica de lisis alcalina (miniprep) descrita por Green y Sambrook (Green and Sambrook, 2016). Esta técnica se utilizó para recuperar plásmidos a partir de suspensiones bacterianas tanto de *E. coli* como de *B. bronchiseptica*. Para la purificación del ADN plasmídico se utilizó sílica, según la técnica descrita por Boyle (Boyle and Lew, 1995). 10 µl de una suspensión de sílica se agregaron al sobrenadante de la lisis alcalina, se mezcló vigorosamente y se centrifugó durante 10 segundos a máxima velocidad. La sílica se lavó dos veces con 300 µl de solución de lavado de sílica y se dejó secar a temperatura ambiente. Para desprender el ADN de la sílica se resuspendió el pellet en 40 µl de agua desionizada, se calentó durante 5 minutos en un baño a 65°C, se centrifugó durante 3 minutos a 10000 rpm y el sobrenadante conteniendo el ADN plasmídico se transfirió a un tubo limpio.

Alternativamente y cuando se necesitaba ADN plasmídico con un mayor grado de pureza, éste fue aislado mediante el uso de kit comerciales (QIAGEN, Bioneer, AP biotech), acorde a las indicaciones dadas de los proveedores.

b. Cuantificación de ADN

La concentración de las preparaciones de ADN se analizó por la medida de absorbancia a 260 nm utilizando un equipo Nanodrop ND1000 (Thermo Fisher) o bien por medida de fluorescencia utilizando un equipo Qubit 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher) y su correspondiente kit.

c. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Durante el transcurso de este trabajo se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar secuencias nucleotídicas con el objetivo de usarlas para su clonación, secuenciación o bien para corroborar la presencia de dicha secuencia y su longitud en una cepa o un vector.

Se emplearon las siguientes ADN polimerasas comerciales con actividad 3'-5' exonucleasa correctora de errores: HiFi (KAPA Biosystems), PFU (PB-L Productos Bio-Lógicos), VELOCITY (Bioline) y Q5 High-Fidelity (NEB) para obtener productos de amplificación de alta fidelidad para ser clonados o secuenciados. Alternativamente, para el chequeo de construcciones y para la evaluación de mutantes se utilizaron las siguientes ADN polimerasas comerciales sin actividad correctora de errores: Taq (KAPA Biosystems), Taq (Genbiotech) y EasyTaq (TransGene Biotech). Se utilizó un termociclador de tubos de pared delgada marca BIOR.

Para cada reacción de PCR se utilizaron las cantidades de *primers*, enzima, ADN molde, dNTPs y Mg^{+2} sugeridas por el fabricante de la enzima. Las condiciones de ciclado a utilizar fueron determinadas para cada reacción ensayando un gradiente de temperatura en la etapa de hibridación y eligiendo aquella temperatura que brindó el mejor resultado.

Dado que el genoma de las bacterias del género *Bordetella* presentan un alto porcentaje de G-C (68,07%), se agregó dimetilsulfoxóidio (DMSO) en una concentración final de 3% v/v en aquellas preparaciones de PCR en las que se utilizó ADN de *B. bronchiseptica* como molde. El agregado de DMSO previene la formación de estructuras secundarias del ADN y disminuye la temperatura de *melting*.

Los moldes de ADN para las amplificaciones por PCR fueron obtenidos por algún método de purificación de ADN - como extracción de ADN genómico o miniprep para ADN plasmídico- o bien, por el lisado de las células por calentamiento.

Los *primers* utilizados a lo largo de este trabajo se listan en el Anexo II. Fueron diseñados utilizando el servidor *online* gratuito Primer3 Input y su síntesis estuvo a cargo de Thermo Fisher o Eurofins. Los primers fueron resuspendidos en *buffer* TE.

d. Electroforesis en gel de agarosa

La visualización de ADN genómico, ADN plasmídico, productos de digestiones enzimáticas y productos de PCR se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa en concentraciones de 0,8-2% p/v en TBE, dependiendo del tamaño de los fragmentos de ADN esperados. Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo en *buffer* TBE y a un voltaje que varió entre 80-120V suministrado por una fuente PowerPac (Biorad).

Durante la preparación de la solución de agarosa se adicionó SyberSafe (Invitrogen) en la concentración indicada por el proveedor por lo que los fragmentos de ADN fueron visualizados utilizando una fuente de luz azul incorporada al equipo transiluminador y registrados con una cámara fotográfica acoplada.

e. Secuenciación de ADN

Las secuencias de ADN fueron enviadas al servicio MacroGen para su secuenciación, cumpliendo con los requerimientos de cantidad de ADN sugeridos y proveyendo los primers de secuenciación cuando era necesario.

f. Digestión por enzimas de restricción

Las digestiones con enzimas de restricción de plásmidos y productos de PCR se realizaron bajo las condiciones óptimas para la enzima, siguiendo las indicaciones de *buffer*, temperatura y tiempo de incubación indicados por el fabricante (Promega, New England Biolabs). Las reacciones se llevaron a cabo habitualmente con 0,5-2,5 µg de ADN, 0,1-0,5 µl del *buffer* 10X correspondiente suministrado por la casa comercial, 1-5 µg de BSA y 5-25 unidades de enzima en un volumen final de 10-50 µl. Cuando fue necesario, las enzimas fueron inactivadas previo su agregado en reacciones de ligación mediante un calentamiento a 65°C durante 15 minutos.

g. Ligaciones

Las reacciones de ligación con la enzima DNA ligasa T4 se llevaron adelante siguiendo las indicaciones de los proveedores (Promega, New England BioLabs). Generalmente, las reacciones de ligación se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente o durante 16 horas a 4°C. En todos los casos, la relación molar de inserto : vector utilizada fue de 3:1.

h. Células electrocompetentes de *E. coli* y electroporación.

Para la preparación de células electrocompetentes de *E. coli* se siguió la técnica de Tung y Chow. Se inocularon 250 ml de medio LB líquido sin NaCl con 500 µl de un cultivo de la cepa de *E. coli* de interés (S17-1 o DH5α) crecido durante 16 horas en medio LB líquido sin NaCl. El cultivo se incubó a 37°C con agitación de 160 rpm hasta alcanzar una $DO_{600} = 0,6-0,8$ unidades. El cultivo se colocó en hielo por 15 minutos y a partir de ese momento, todo el proceso se continuó en frío. Las células se centrifugaron a 4000 xg por 15 minutos a 4°C y se lavaron dos veces con 100 ml de glicerol estéril 10% v/v. Finalmente, las células se resuspendieron suavemente en 1 ml de solución de glicerol estéril 10% v/v y se fraccionaron en alícuotas de 50 µl que fueron conservadas a -80°C hasta su utilización. La eficiencia de transformación se determinó antes de que las células electrocompetentes fueran utilizadas para un ensayo, siendo el valor mínimo aceptable 10^6 UFC/ng DNA.

Las electrotransformaciones de las células *E. coli* electrocompetentes, preparadas o comerciales, se realizaron en un equipo Gene Pulser BioRad y en cubetas de 0,2 ml bajo las condiciones recomendadas por el fabricante (25 mF, 200 W, 2,5 kV). Las ligaciones habitualmente se desalaron mediante el uso de membranas de acetato de celulosa y se electroporaron 10 µl de las mismas. En los casos en que las ligaciones no fueron desaladas se utilizaron 1-5 µl para electroporar. Tras la electrotransformación se adicionó inmediatamente 1 ml de LB líquido estéril a las células y éstas fueron incubadas a 37°C durante una hora, a fin de permitir la expresión de la proteína asociada a la resistencia a antibiótico codificada en el

plásmido incorporado. Por último, las células fueron plaqueadas en medio LB selectivo y se incubaron 24 horas a 37°C.

i. Conjugación

Las conjugaciones se realizaron siguiendo el protocolo desarrollado en nuestro laboratorio (Ambrosis, Fernández and Sisti, 2020).

En primera instancia, se tomó 1 ml de un cultivo de la cepa *E. coli* S17-1 donadora, incubado a 37°C con agitación durante 5 horas, y se centrifugó a 650 xg durante 5 minutos. El paquete celular se resuspendió en 1 ml de LB sin antibiótico y adicionalmente se resuspendió biomasa obtenida de una placa de BGA de la cepa *B. bronchiseptica* receptora. El tubo con la mezcla de cultivos se centrifugó nuevamente a 659 xg por 5 minutos y las células se resuspendieron en un volumen de 50 µl de LB sin antibiótico. Luego se plaquearon en forma de gota sobre una placa BGA sin antibiótico, previamente espatulada con 100 µl de MgCl 2M y se incubaron 18 horas a 37°C. Tanto la cepa donora *E. coli* S17-1 como la receptora *B. bronchiseptica* fueron plaqueadas junto a la conjugación como controles.

La biomasa de la mezcla de conjugación, así como los controles, fueron resuspendidos en PBS estéril y sembrados como diluciones seriadas 1/10 en medio sólido selectivo, suplementado con estreptomycinina y el antibiótico correspondiente al plásmido conjugado (gentamicina o kanamicina).

j. Clonación por recombinación *in vivo* en *Saccharomyces cerevisiae*

Estrategia y diseño del experimento

Además de la técnica convencional de clonación de ADN por ligación con T4 DNA ligasa se utilizó la técnica de clonación por doble recombinación *in vivo* en la levadura *S. cerevisiae* InvSc1, descrita por Shanks y colaboradores (Shanks *et al.*, 2009). En esta técnica se utiliza la maquinaria de recombinación de la levadura para ligar fragmentos con extremos homólogos. Tras el *shock* térmico por el cual fueron introducidos los fragmentos a clonar, el/los inserto/s y el plásmido linealizado, la levadura activa la maquinaria de reparación de ADN y une las secuencias homologas mediante recombinación. La particularidad de la cepa de levadura utilizada es que es auxotrófica de uracilo por lo que se utiliza al medio URA3⁻ como medio selectivo.

De acuerdo al propósito del producto de clonación se utilizaron dos tipos de vectores, ambos con origen de replicación apto para *S. cerevisiae* y que presentan el gen *ura3*. El pMQ30 fue utilizado para mutar genes de *B. bronchiseptica* mediante delección limpia mientras que el

pMQ72 fue utilizado para expresar genes ya que cuenta con un promotor inducible por arabinosa. Como controles del procedimiento las levaduras fueron incubadas en forma separada con el vector linealizado con *Sma*I, el vector sin digerir y una muestra sin vector.

Como fragmentos a introducir en los vectores se utilizaron productos de amplificación obtenidos mediante el uso de una ADN polimerasa de alta fidelidad. Los *primers* utilizados para la PCR fueron diseñados específicamente para dicho propósito ya que en su extremo 5' se incorporó una secuencia de entre 20 y 40 nucleótidos complementaria al sitio del vector en donde se iba a incorporar el producto de PCR. De esta manera, los extremos del producto de amplificación eran homólogos a los extremos del vector linealizado. En los casos en los que se deseaba unir más de un fragmento, como por ejemplo la región río arriba y río abajo de un gen, los *primers* fueron diseñados de manera tal que ambos productos de amplificación presentaban una secuencia homóloga entre ellos en un extremo y una secuencia homóloga al vector en el otro extremo.

Protocolo de clonación

A partir de colonias aisladas de *S. cerevisiae*, crecidas en medio sólido YPD a 30°C durante 18 horas, se inocularon 5 ml de medio YPD. El cultivo líquido se incubó con agitación (160 rpm) a 30°C durante toda la noche. Se tomaron cuatro alícuotas de 500 µl, una correspondiente a la mezcla de ligación y tres para llevar adelante los controles correspondientes, y se centrifugaron durante 10 segundos a 8000 xg. Los pellets conteniendo las levaduras fueron resuspendidos en 500 µl de *buffer* TE, centrifugados nuevamente bajo las mismas condiciones y resuspendidos en 500 µl de solución *Lazy Bones*. A estas suspensiones se les agregó 20 µg de ADN de esperma de salmón desnaturalizado mediante ebullición y pasaje rápido a baño de hielo. A la mezcla de clonación se le adicionaron 50 µl del producto de amplificación y 30 µg de plásmido digerido, mientras que a dos controles se les adicionaron 30 µg de plásmido sin digerir (para corroborar que las levaduras auxotróficas de uracilo pueden crecer con un plásmido que lleve el gen *ura3* en el medio selectivo URA3⁻) o bien, 30 µg de plásmido digerido (para verificar que las colonias obtenidas a partir de la mezcla de clonación capaces de crecer en el medio selectivo URA3⁻ tengan inserto y no lleven plásmido sin digerir). El cuarto control, al cual no se le agregó nada, es necesario para corroborar que las levaduras auxotróficas no pueden crecer en el medio selectivo URA3⁻.

Tras este último paso las suspensiones fueron agitadas vigorosamente durante un minuto e incubadas durante 3 días a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de incubación, las muestras recibieron un *shock* térmico de 10 minutos a 42°C. Posteriormente fueron lavadas dos veces con *buffer* TE y plaqueadas en el medio selectivo URA3⁻. Las placas fueron incubadas a

temperatura ambiente durante 3 a 5 días, periodo en el que deben aparecer colonias blancas únicamente en las placas correspondientes a la mezcla de clonación y al control positivo (plásmido sin digerir).

Para recuperar las construcciones a partir de las colonias de levadura se utilizaron kits comerciales para la obtención de ADN plasmídico, siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. La biomasa de las levaduras se recolectó a partir de la placa de cultivo correspondiente a la mezcla de clonación con 2 ml de agua desionizada estéril. La suspensión se centrifugó durante 10 segundos a 8000 xg y el pellet se resuspendió en 250 µl de la solución 1 del kit (solución de resuspensión). Luego se agregaron 250 µl de la solución de lisis y 250 µl de perlas de vidrio de 0,5 mm, para facilitar el proceso de lisis. La mezcla se agitó vigorosamente durante 2 minutos y luego se dejó reposar durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente se agregaron 350 µl de la solución de precipitación (fría), se mezcló por inversión y se incubó durante 5 minutos en hielo. Por último, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 16000 xg y se continuó con el protocolo de obtención de ADN plasmídico de acuerdo a las indicaciones del fabricante del kit. El ADN plasmídico recuperado fue transformado por electroporación en una cepa de *E. coli* S17-1 electrocompetente.

k. Obtención de mutantes por delección limpia en *B. bronchiseptica*

Para obtener mutantes por delección limpia en *B. bronchiseptica* se aplicó el protocolo desarrollado por el Dr. Ambrosis en nuestro laboratorio (Ambrosis, Fernández and Sisti, 2020). La estrategia utilizada se basa en la delección del gen de interés mediante un evento de doble recombinación homóloga en el genoma de *B. bronchiseptica*, seguida de un proceso de contra selección con sacarosa. Para ello se utilizó un plásmido no replicativo en *B. bronchiseptica* que posee en su secuencia el cassette codificante para el gen *sacB*, que permite la selección de dobles recombinantes por contra selección, conteniendo 500-700 pb correspondientes a cada una de las secuencias nucleotídicas lindantes al gen a delecionar. El plásmido utilizado, el pMQ30 (Gm^R), fue transferido a partir de una cepa de S17-1 a la cepa de *B. bronchiseptica* adecuada mediante conjugación. Las colonias de *B. bronchiseptica* hemolíticas y resistentes a Str y a Gm fueron seleccionadas para llevar adelante el protocolo de contra selección con sacarosa. Las bacterias resistentes a Gm incorporaron el plásmido conjugado a su genoma mediante el primer evento de recombinación homóloga. Estas colonias se repicaron en forma de réplica en una placa BGA sangre suplementada con los antibióticos correspondientes y en una placa de LB sin NaCl suplementada con sacarosa 15% p/v (LB-Sac). Tras 24 horas de incubación a 37°C, los repiques que crecieron adecuadamente en BGA-sangre y no crecieron en el medio LB-Sac fueron

utilizados para inocular un cultivo de 5 ml en medio SS suplementado únicamente con Str. Estos repiques no crecieron en el medio LB-Sac ya que expresaban el gen *sacB*, cuyo producto génico genera compuestos tóxicos en presencia de sacarosa en numerosas bacterias Gram negativas. El cultivo líquido fue incubado durante toda la noche a 37°C y con agitación (160 rpm). Luego, se tomó una alícuota de 1 ml y se prepararon diluciones seriadas desde 10^{-1} a 10^{-6} , que fueron plaqueadas en paralelo en el medio de cultivo LB-Sac y en LB, como control de crecimiento. Estas placas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C. Las colonias que crecieron en la placa de LB-Sac fueron repicadas en una placa de BGA-sangre sin antibiótico (o únicamente con Str), ya que corresponden a las bacterias que sufrieron un segundo evento de recombinación y liberaron el plásmido. Estas placas se incubaron 24 horas a 37°C y posteriormente se identificaron los dobles recombinantes que eran mutantes deletacionales mediante PCR.

3. Técnicas utilizadas para análisis transcriptómicos

a. Obtención de ARN

Se obtuvo ARN a partir de un cultivo líquido de *B. bronchiseptica* crecida en SS. Tras 14 horas de incubación a 36°C ($DO_{650} = 1$), el cultivo se centrifugó a 14600 xg durante 2 minutos y el pellet se resuspendió en 250 µl de RNA Protect Bacterial Reagent (Qiagen), se centrifugó nuevamente y se conservó a -80°C.

EL ARN se extrajo de las bacterias presentes en el pellet mediante el método de RNA snap. Brevemente, este método consiste en agregar 100 µl de la solución de extracción de ARN al pellet congelado, tras haber removido la solución de RNA Protect con la que se congeló. La muestra se vortexea vigorosamente y se incuba a 95°C durante 7 minutos. Tras una centrifugación de 5 minutos a 16000 xg, se transfiere el sobrenadante a un tubo limpio sin perturbar el pellet gelatinoso. Se purificó el ARN presente en el sobrenadante usando el kit comercial RNeasy Mini Kit (Qiagen), siguiendo las indicaciones del proveedor.

Las muestras se trataron con el kit TURBO DNA free (Ambion), siguiendo las indicaciones del proveedor para un tratamiento riguroso con DNAsa, y nuevamente se purificaron con columnas RNeasy. Se cuantificó el ARN purificado y se chequeó que estuviera libre de ADN por qPCR.

b. Cuantificación de ARN

La cuantificación de ARN se realizó con el equipo Qubit 3.0 Fluorometer, utilizando Qubit RNA HS Assay kit (high sensitivity) o Qubit RNA BR Assay kit (broad range), acorde a lo que fuera necesario.

c. Retro-transcripción

Para la síntesis de ADN complementario se utilizó la retrotranscriptasa M-MLV (Promega), siguiendo las especificaciones dadas por el fabricante. Se utilizaron 500 ng de ARN como molde y *primers* específicos para los genes *target*.

d. qRT-PCR

Se cuantificaron los ARN mensajeros de determinados genes *target* mediante qRT-PCR utilizando *primers* específicos para dichos genes. Para los ensayos se utilizó el kit comercial Excella SYBER Green PCR master mix (World wide Medical Products), siguiendo el protocolo del proveedor para 1 μ l de ADNc, y el termociclador StepOne Plus qPCR (Applied Biosystem). Se realizaron tres réplicas biológicas, con tres réplicas técnicas para cada gen analizado y se utilizó al gen *recA* como gen de referencia, dado que se expresa de manera constitutiva en *B. bronchiseptica*. Los niveles de expresión se calcularon con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

e. Secuenciación masiva de ARN mensajero (RNA-seq)

El ARN obtenido del cultivo de 14 horas de *B. bronchiseptica* en medio SS, purificado y libre de ADN, fue tratado con el kit comercial Ribo-Zero rRNA removal kit (Illumina Inc.) para eliminar el ARN ribosomal y se usó el kit comercial ScriptSeq (Illumina Inc.) para construir las bibliotecas. Las muestras fueron secuenciadas en la plataforma HiSeq Illumina en las instalaciones de Genómica de la Universidad de Marshall, Estados Unidos (Marshall University Genomics Core Facility).

El análisis de los productos de la secuenciación se llevó adelante con el programa CLC Genomics Workbench 9.5.4. Las lecturas fueron recortadas según los puntajes de calidad, con una configuración estándar y fueron mapeadas con el genoma de referencia de *B. bronchiseptica* RB50 (ATCC BAA-588; RefSeq: NC_002927.3).

f. Construcción de un sistema reportero con dos proteínas fluorescentes

A partir del plásmido pGFLIP (Km^R) que expresa constitutivamente a la proteína verde fluorescente GFP, se construyó el plásmido pGFLIP p-*E2crimson*. Éste se obtuvo a partir del reemplazo de la región *flp* del pGFLIP, ubicada río abajo del sitio de clonado múltiple (MCS), por la región codificante (CDS) de la proteína roja E2Crimson. Como primer paso, se amplificó con

una ADN polimerasa de alta fidelidad (Q5 High Fidelity DNA polymerase, NEB) el CDS del gen *e2crimson* usando como molde al plásmido pUC18T-mini-Tn7T-Gm-*E2crimson*. Los *primers* utilizados, KpnI-E2Crimson Fw y StuI-E2Crimson Rv, fueron diseñados de manera tal que el amplicón tuviera un sitio KpnI en su extremo 5' y un sitio StuI en su extremo 3'. El producto de amplificación de 733 pb fue purificado a partir del gel de agarosa en el que se realizó la corrida electroforética con el kit QIAX II Gel Extraction Kit (Qiagen). Por su parte, el plásmido pGFLIP fue digerido con las enzimas de restricción KpnI y StuI, liberando el gen de la recombinasa *flp* (1272 pb). El esqueleto del plásmido (5733 pb) fue purificado a partir del gel de agarosa con el kit QIAX II Gel Extraction Kit. El amplicón conteniendo al gen *e2crimson* se digirió con las enzimas de restricción KpnI y StuI y luego de inactivar a las enzimas, se ligó con el fragmento del esqueleto del plásmido pGFLIP digerido KpnI-StuI, con la enzima T4 DNA ligasa (NEB). La construcción fue secuenciada para corroborar que fuera el producto esperado. El plásmido resultante, pGFLIP p-*e2crimson*, expresa constitutivamente GFP y lleva el gen *e2crimson* sin promotor, pero río abajo del MCS.

La estrategia para introducir los promotores de interés en el MCS del pGFLIP p-*e2crimson* fue digerir al plásmido con las enzimas de restricción KpnI y HindIII y a su vez, amplificar los promotores de interés con *primers* que incluyesen los sitios de reconocimiento de dichas enzimas. Tras amplificar los promotores de interés los amplicones fueron digeridos con KpnI y HindIII. Tras inactivar las enzimas de ambas digestiones, el plásmido y los productos de amplificación fueron ligados y el producto de ligación fue electrotransformado en la cepa de *E. coli* S17-1.

g. Determinación de actividad promotora mediante el sistema pGFLIP p-*e2crimson*

Para comprobar el funcionamiento del sistema reportero pGFLIP p-*e2crimson* primero se clonó el promotor del gen *bvgA*. La amplificación del promotor de *bvgA* (*pbvgA*) se llevó adelante con los *primers* HindIII *pbvgA* Fw y KpnI *pbvgA* Rv y se utilizó como molde ADN genómico de *B. bronchiseptica*. Para clonar al promotor de la flagelina (*pflaA*) se utilizaron los *primers* KpnI *pflaA* Fw y HindIII *pflaA* Rv y ADN genómico de *B. bronchiseptica* como molde. En ambos casos se aplicó la estrategia de clonación en el plásmido pGFLIP p-*e2crimson* mencionada anteriormente. Tras secuenciar las construcciones obtenidas, las cepas S17-1 conteniendo las construcciones fueron conjugadas con *B. bronchiseptica wild type*, con RB54 (bloqueada en *bvg-*) y con RB53 (bloqueada en *bvg+*).

Para llevar adelante la determinación de la actividad promotora de *pbvgA* o *pflaA*, las cepas de *B. bronchiseptica* llevando las construcciones correspondientes se cultivaron en un medio de cultivo líquido SS complementado y suplementado con kanamicina durante 18 horas a 37°C y con agitación. Luego, se repicaron en un nuevo cultivo líquido de 10 ml con una DO_{650} inicial de 0,2. Transcurridos los primeros 30 minutos de incubación, se tomaron 400 µl de cada cultivo y se transfirieron a un tubo de 0,5 ml. En paralelo, se tomaron 400 µl de medio SS estéril como control (blanco). Los tubos de 0,5 ml con las muestras fueron centrifugados durante 3 minutos a 15000 xg y el pellet fue resuspendido en 200 µl. Estas muestras corresponden al primer tiempo de muestreo. En los siguientes tiempos de muestreos se tomaron 400 µl o 200 µl de acuerdo a cuán crecido estaba el cultivo, ya que a partir de cierta densidad óptica no es necesario centrifugar para concentrar la muestra. La medición de la absorbancia de ambas proteínas fluorescentes se hizo utilizando un Fluorómetro DeNovix. Para medir la fluorescencia de la GFP se utilizó el canal azul (excitación 470 nm, emisión 514-567 nm) mientras que para medir la fluorescencia de la E2Crimson se utilizó el canal rojo (excitación 635 nm, emisión 665-740 nm).

$$\text{Proporción E2Crimson/GFP} = \frac{\text{Fluorescencia roja de la muestra} - \text{Fluorescencia roja del blanco}}{\text{Fluorescencia azul de la muestra} - \text{Fluorescencia azul del blanco}}$$

4. Técnicas utilizadas para análisis proteómicos

a. Obtención de proteínas

i. Obtención de proteínas totales

Las muestras de proteínas totales se obtuvieron a partir de cultivos líquidos de *B. bronchiseptica* de 10 o 50 ml crecidos en las condiciones deseadas. Inicialmente se cosecharon los cultivos a 8000 xg durante 30 minutos a 4°C y se resuspendieron los pellets en un volumen pequeño de *buffer* Lap A, generalmente de 1ml. Para la ruptura de las células se transfirieron las suspensiones a tubos conteniendo 500 mg de esferas de vidrio (1 mm), a los cuales se le aplicaron 6 pulsos del programa 5 con el equipo homogeneizador Precellys 24 (Bertin Technologies), colocando los tubos en hielo entre pulsos para mantener las muestras en frío. Las esferas de vidrio y los restos celulares se separaron mediante una centrifugación a 8000 xg a 4°C por 30 minutos. Los sobrenadantes lípidos conteniendo las proteínas totales se transfirieron cuidadosamente a tubos nuevos.

Alternativamente, se prepararon muestras de proteínas totales lisando una suspensión bacteriana con DO_{650} de 10 unidades. La lisis se realizó por calentamiento de las muestras

durante 10 minutos, seguido de sonicación en baño por 5 minutos. Los restos celulares se separaron por centrifugación. Todas las muestras se conservaron a -20°C.

ii. Obtención de proteínas de sobrenadante

La obtención de proteínas presentes en los sobrenadantes de cultivos bacterianos para la detección de Bsp22 por *Western blot* se realizó de la siguiente manera. Inicialmente se centrifugaron 15 ml de un cultivo líquido de *B. bronchiseptica*, crecido durante 16 horas con una DO₆₅₀ de 0,6 unidades. Tras la centrifugación a 8000 xg a 4°C durante 10 minutos, se separó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente. Luego, la muestra fue filtrada (Durapore Millex, 0,22 µm) y se le agregó PSMF 1 mM. Las muestras fueron concentradas (30x) por centrifugación en tubos de 15 ml Amicon con un filtro con corte de 10 kDa. Específicamente, se centrifugaron 8 ml de muestra durante 20 minutos, a 4000 xg y 10°C. Se recuperaron las muestras con proteínas con un peso molecular mayor a 10 kDa en el compartimiento superior del tubo Amicon y se congelaron a -80°C.

La obtención de las proteínas presentes en los sobrenadantes de cultivos bacterianos para la detección de ACT por *Western blot* o para la composición de medios compuestos para biofilm, se obtuvieron de manera similar a la explicada anteriormente, pero a partir de un cultivo líquido de *B. bronchiseptica* crecido durante 16 horas con una DO₆₅₀ final de 1,5-2 unidades y las muestras no fueron filtradas con filtro de 0,22 µm ni concentradas.

b. Purificación de BvgR

i. A partir de *B. bronchiseptica*

La purificación de BvgR fusionada a la proteína solubilizadora MBP se realizó a partir de la cepa ΔbvgR conteniendo el plásmido pBBR1MCS5 pnptII bvgR-MBP. Como control se utilizó la cepa ΔbvgR con el plásmido sin inserto (pBBR1MCS5 pnptII). Para ello se inocularon dos cultivos líquidos de 125 ml de SS complementado y suplementado con gentamicina, cada uno con una de las cepas y se incubaron a 37°C durante 16-18 horas con agitación (160 rpm). Transcurrido el tiempo de incubación, se midió la DO₆₅₀ de los cultivos y cada uno de éstos fue transferido a dos tubos de 50 ml y centrifugados a 8000 xg durante 30 minutos y a 4°C. El sobrenadante fue descartado mientras que el pellet celular fue resuspendido en 1-4 ml de de buffer A con 20 mM de imidazol frío y se les agregó PMSF 1 mM. Las suspensiones celulares fueron transferidas a tubos de 2 ml conteniendo 500 mg de esferas de vidrio (1mm) y las bacterias fueron lisadas con el equipo homogeneizador Precellys 24, como en el caso de la obtención de proteínas totales.

Tras la centrifugación de las muestras a 8000 xg durante 30 minutos a 4°C, se recuperaron los sobrenadantes (extractos crudos).

Cada extracto crudo fue transferido a un tubo de 15 ml conteniendo 1 ml de resina de níquel y agitado durante 30 minutos. Luego, los tubos fueron centrifugados durante 6 minutos a 4000 xg a 4°C y se recogieron los sobrenadantes (flow through). La resina fue lavada 5 veces con un total de 10 volúmenes de *buffer A* con 20 mM de imidazol, con agitación durante 10 minutos seguida de centrifugación entre cada lavado. Para eluir la proteína adherida a la resina se agregaron 2 ml de *buffer A* con 200 mM de imidazol a cada muestra y se agitaron durante 10 minutos. Los sobrenadantes fueron recuperados (primera elución) y la resina fue lavada nuevamente con 2 ml de *buffer LapA* con 200 mM de imidazol (segunda elución).

ii. A partir de *E. coli*

Los intentos de purificación de BvgR a partir de *E. coli* se realizaron con la cepa *E. coli* BL21, llevando los plásmidos pMQ72 *bvgR6His* y pET200-*bvgR6His*. Ambos vectores de expresión cuentan con promotores inducibles, arabinosa e IPTG respectivamente. Como controles se utilizaron las cepas BL21 con los plásmidos vacíos.

Los cultivos de BL21 con dichos vectores se llevaron adelante en 125 ml de medio LB líquido y fueron incubados a 37°C, 28°C y 15°C durante 16 horas. Adicionalmente, se ensayaron concentraciones crecientes de los inductores. Luego de la incubación, se tomó 1 ml de cada cultivo, se centrifugó durante 3 minutos a 13500 rpm y se le adicionó *buffer* Laemmli 4X al pellet. Las muestras fueron hervidas durante 10 minutos, sonicadas por 5 minutos y posteriormente fueron corridas en geles de SDS-PAGE. Dado que en ninguna de las condiciones se observó expresión de BvgR, no se procedió al protocolo de purificación con níquel.

c. Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas obtenidas con el método de ruptura con el homogeneizador Precellys 24 (Bertin Technologies) se aplicó la técnica de Bradford. Se realizó una curva de calibración con 5 concentraciones distintas de BSA comercial (0,05 mg/ml, 0,1mg/ml, 0,2mg/ml, 0,4mg/ml y 0,5mg/ml), se empleó un reactivo comercial (BioRad) y la absorbancia a 595 nm se midió en un lector de microplacas. La determinación de la concentración de proteínas en las muestras de interés se hizo por triplicado tanto de manera directa como en una o más diluciones.

Para la cuantificación de proteínas presentes en los sobrenadantes de cultivo bacteriano se utilizó el equipo Qubit Fluorometer 3.0 y el kit Qubit Protein Assay (Life Technologies, Thermo Fisher).

d. Electroforesis en SDS-PAGE

Las corridas electroforéticas de las muestras de proteínas se llevaron a cabo en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Los geles de separación se prepararon con distintas concentraciones de poliacrilamida (acrilamida: bisacrilamida 30:0,8) según la naturaleza de las muestras de proteínas a analizar, en una solución de Tris-HCL con SDS 1 µg/ml con pH = 8,8. Dicha concentración varió entre 10 y 15%, siendo habitualmente de 12,5%. Los geles de apilamiento (stacking) se prepararon con un 4% de poliacrilamida en una solución Tris-HCL y SDS 1 µg/ml con pH = 6,8. Las corridas se realizaron en equipos Miniprotean II (BioRad) durante 60 a 90 minutos a 100-120v en *buffer* de electroforesis. Las muestras de proteínas fueron preparadas con *buffer* Leammli 4X como *buffer* de desnaturalización y siembra.

Para la visualización de los perfiles electroforéticos se utilizó la tinción con Azul Coomassie. Inmediatamente finalizada la corrida electroforética, los geles se incubaron en la solución colorante a temperatura ambiente durante aproximadamente 16 horas y luego fueron lavados con una solución decolorante.

e. Western blot

Las muestras de proteínas sometidas a SDS-PAGE fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa o de PVDF utilizando un equipo Mini Trans-Blot Cell (BioRad), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. En el caso de las membranas de PVDF, éstas fueron tratadas previamente con agua, metanol y *buffer* de transferencia, mientras que en el caso de las membranas de nitrocelulosa fueron tratadas únicamente con *buffer* de transferencia previo al procedimiento. Al dispositivo de transferencia, conteniendo el gel a transferir y la membrana tratada, se le aplicó una diferencia de potencial de 100 V durante 1 hora en baño de agua y hielo. Luego se procedió al bloqueo de la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de leche descremada en polvo 5,0 % p/v en TBS (TBS-leche). Finalizado el tiempo de incubación, se reemplazó la solución de bloqueo con una solución de TBS-leche conteniendo el anticuerpo primario. La membrana se incubó con dicha solución durante 16 horas a una temperatura de 4° y con agitación suave. Posteriormente, se retiró la solución con el anticuerpo primario y se realizaron seis lavados con TBS-leche. Se le adicionó a la membrana el anticuerpo secundario, diluido en TBS-leche, y se incubó durante 2 horas y media a temperatura ambiente

y con agitación suave. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron tres lavados con una solución Tween 20 0.1% v/v en TBS (TBS-tween) y un último lavado con TBS. En el caso de los anticuerpos conjugados a HRP, la membrana se reveló con el sustrato quimioluminiscente comercial Clarity™ Western ECL Substrate (Bio Rad #1705060) y un adquisidor de imágenes BioRad mientras que, en el caso de los anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina, se utilizó una solución con el sustrato de la fosfatasa alcalina, se incubó el tiempo necesario para que se desarrollase el color y luego la reacción se detuvo con agua destilada.

h. Dot blot

Los ensayos de *Dot blot* realizados en este trabajo fueron llevados adelante para determinar la cantidad de una proteína en particular en la superficie celular de la bacteria. Las cepas de *B. bronchiseptica* a estudiar fueron cultivadas en medio líquido SS a 37°C durante 16-18 horas con agitación (160 rpm). Transcurrido ese tiempo los cultivos fueron diluidos de manera tal que todos presenten la misma DO. Luego, se tomó una alícuota de 1,5 ml de cada preparación y se centrifugó durante 3 minutos a 16000 xg. Los pellets luego fueron lavados con 1 ml *buffer* LapA dos veces. De acuerdo a la abundancia de la proteína en cuestión en *B. bronchiseptica* los pellets celulares lavados fue resuspendidos en un volumen de *buffer* LapA de manera que la suspensión tenga una DO₆₅₀ de 1. A partir de dicha suspensión se hicieron tres diluciones a la mitad ($\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$) y se sembraron en forma de gota 10 μ l de cada suspensión y de sus respectivas diluciones, por triplicado, en una membrana de nitrocelulosa. Una vez absorbidas las gotas y seca la membrana de nitrocelulosa, se incubó durante 1 hora con TBS-leche. Tras la etapa de bloqueo, el procedimiento realizado con la membrana de *Dot blot* fue idéntico al de los *Western blots*, con los mismos tiempos de incubación de los anticuerpos primarios y secundarios, lavados y el proceso de revelado.

Los anticuerpos utilizados durante estos ensayos se detallan a continuación en la Tabla B.4:

Tabla B.4. Anticuerpos utilizados para blottings.

Anticuerpo primario	Descripción	Referencia
Anti-fla	Anticuerpo policlonal de ratón específico para flagelina	Tesis Dr. Julieta Fernandez
Anti-bsp22	Anticuerpo policlonal de ratón específico para Bsp22	(M E Gaillard <i>et al.</i> , 2011)
Anti-ACT (3D1)	Anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce específicamente la porción distal del dominio catalítico de la adenilato ciclasa de <i>B. pertussis</i>	(Lee <i>et al.</i> , 1999)
Anti-ACT	Anticuerpo policlonal de ratón para adenilato ciclasa de <i>B. pertussis</i>	

Anticuerpo secundario	Descripción	Referencia
Anti-ratón - HRP	Anticuerpo de cabra que reconoce IgG de ratón y fusionado a HRP (peroxidasa de rábano)	BioRad
Anti-ratón - PA	Anticuerpo de cabra que reconoce IgG de ratón y fusionado a PA (fosfatasa alcalina)	Invitrogen

5. Técnicas para análisis fenotípicos

a. Ensayos de formación de biofilm en microplacas de PVC

Los ensayos de formación de biofilm se realizaron en microplacas Corning 96 Well Clear PVC Assay Microplate (Sigma-Aldrich) esterilizadas por radiación UV y se cuantificaron por su tinción con cristal violeta.

El medio de cultivo base para los experimentos de biofilm fue el medio SS suplementado el cual fue modificado según el diseño de cada ensayo. Como agente modulador de fase de *Bordetella* se utilizó al ácido nicotínico en concentraciones finales en un rango entre 0,5 mM, y 2 mM según fuera necesario y se indica en cada caso. Con el objetivo de evaluar el efecto de las proteínas secretadas durante el cultivo bacteriano, el medio de cultivo de biofilm se preparó con volúmenes iguales de SS y de los sobrenadantes obtenidos a partir de dichos cultivos, como se explicará en el capítulo 4.

Las bacterias ensayadas fueron inicialmente aisladas a partir de un stock de -80°C en placas BGA y tras 72 horas de incubación a 37°C, repicadas en medio SS suplementado con sangre y el antibiótico correspondiente e incubadas nuevamente en estufa por 48 horas.

Se resuspendieron colonias aisladas hemolíticas en medio SS suplementado y se llevaron a una DO₆₅₀ de 1. Estas suspensiones se agregaron a los medios de cultivo a ensayar en una relación 1:10, los cuales se alicuotaron de a 100 µl en las fosas de las placas de 96, por cuadruplicado, y se incubaron 24 horas a 37°C de manera estática en cámara húmeda. Los medios de cultivo de biofilm fueron suplementados con distintas concentraciones de ácido nicotínico cuando fue necesario.

Transcurrido el tiempo de incubación, se descartó el cultivo y las fosas se lavaron con agua desionizada tres veces. Para la tinción, se les adicionó 125 µl de una solución de cristal violeta 0,1% p/v a las fosas completamente secas y se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego se lavaron tres veces con agua desionizada y se dejaron secar a temperatura ambiente. En este punto, se registró la formación de biofilm de manera cualitativa por

fotografía. Para la determinación cuantitativa se disolvió el cristal violeta de las fosas en 125 µl de una solución de ácido acético 33% v/v y se transfirieron 100 µl a una placa de fondo plano, a la cual se le realizó la medida de la absorbancia a 595 nm con un lector de placas de ELISA.

b. Ensayos de movilidad en agar semisólido

La capacidad de nadar de las cepas de *B. bronchiseptica* se evaluó en placas de SS suplementado con ágar 0,35% p/v. En los casos indicados, se adicionó MgSO₄ 40 mM como agente modulador de fase. Las placas se inocularon utilizando palillos de madera estériles para tomar colonias hemolíticas aisladas y sembrarlas de manera puntual. Las placas se sellaron con Parafilm® a fin de mantener la humedad del medio y se incubaron a 37° durante 24 horas para las placas con SS semisólido y 18 horas para aquellas placas con SS semisólido con el agregado de MgSO₄. Transcurrido ese tiempo, se midió el diámetro del halo de movilidad.

c. Ensayos de citotoxicidad en macrófagos J774A.1

i. Condiciones de cultivo

Para evaluar la citotoxicidad de las distintas cepas de *B. bronchiseptica* se utilizó la línea celular de macrófagos murinos J774A.1 (ATCC). Los macrófagos J774A.1 fueron crecidos a partir de un stock almacenado en nitrógeno líquido utilizando DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Corning Incorporated) como medio de cultivo, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% penicilina-estreptomicina. La incubación se realizó en estufa a 37°C y una atmósfera con 5% CO₂. Cuando el cultivo alcanzó una confluencia del 70-80%, las células fueron desprendidas con un raspador para células estéril, lavadas con PBS y resuspendidas en medio de cultivo fresco. Para los ensayos de citotoxicidad las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos. Los cultivos fueron desechados luego del pasaje N° 15, para asegurar la estabilidad de la línea. El estado del cultivo celular se evaluó mediante observación microscópica y el recuento celular se realizó con el contador automatizado Countess II (Life Technologies). Las células fueron preservadas en medio DMEM suplementado con DMSO al 5% v/v y congeladas en nitrógeno líquido.

ii. Ensayo de citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad consistieron de la infección de macrófagos J774A.1 crecidos en placas multipocillo con suspensiones bacterianas de distintas concentraciones y la posterior detección de la enzima lactato deshidrogenasa en el medio de cultivo con un kit comercial (Pierce LDH Cytotoxicity assay kit, Thermo Scientific).

Las células, sembradas el día anterior en placas multipocillo, fueron lavadas dos veces con PBS a fin de remover cualquier resto de antibiótico y dos fosas fueron desprendidas y contadas para conocer el número de células por pocillo. La concentración utilizada varió entre 1×10^4 y 3×10^4 células/pocillo.

Los inóculos para la infección se prepararon a partir de cultivos líquidos de las cepas de *B. bronchiseptica* a ensayar, los cuales se diluyeron en medio DMEM suplementado con 10% FBS hasta obtener suspensiones bacterianas que representen una multiplicidad de infección (bacteria:célula) de 1, 10 y 100. El número de bacterias presentes en los inóculos se confirmó por recuento en placa.

Tras los lavados con PBS, 100 μ l de estas suspensiones bacterianas fueron agregadas a las células y las placas se centrifugaron a 500 xg durante 3 minutos para poner en contacto las bacterias con las células. Tras 4 horas de incubación a 37°C, las placas fueron retiradas de la estufa, centrifugadas y el sobrenadante se transfirió a una nueva placa para realizar la detección de LDH, siguiendo las indicaciones del proveedor.

Los ensayos se realizaron por lo menos tres réplicas biológicas, cada una con tres réplicas técnicas.

6. Modelo murino de infección

a. Ensayo de infección

i. Esquema de trabajo seguido

Los ratones empleados durante los ensayos de infección en modelo murino fueron hembras de la cepa CD1 (Charles River, Código: 022) de 5 semanas de edad. Los ratones CD1 se caracterizan por ser un stock exogámico, por lo que presentan variabilidad genética.

El esquema de trabajo seguido durante los ensayos de infección se muestra en la Figura 6.1. Brevemente, los ratones fueron infectados con un total de 1×10^6 UFC de *B. bronchiseptica* por vía intranasal y a los días 1, 4, 7 y 21 posteriores, se les practicó la eutanasia (ver más adelante) y se colectaron las muestras.

Cada ensayo de infección constó de tres grupos: un grupo infectado con *B. bronchiseptica wild type* (4 ratones), un grupo infectado con *B. bronchiseptica Δ bvgR* (4 o 5 ratones) y un grupo que no fue infectado, sino únicamente anestesiado (4 ratones).

ii. Proceso de infección

Las suspensiones bacterianas utilizadas para la infección se prepararon diluyendo con PBS un cultivo líquido de 16 horas, inoculado la noche anterior con colonias hemolíticas de dichas cepas e incubado a 37°C. Previo a la infección, los ratones fueron anestesiados con 200 µl de una solución de 0,77 mg/kg de ketamina y 0,77 mg/kg de xilacina en 0,9% solución salina, administrada de manera intraperitoneal, y posteriormente infectados por vía intranasal mediante el pipeteo de 10 µl de la dosis (5×10^7 UFC/ml) en cada narina del ratón.

Para verificar el número de bacterias viables en el inóculo se plaquearon diluciones seriadas del mismo en placas BGA suplementadas con estreptomycinina. El recuento bacteriano se realizó tras 48-72 horas de incubación a 37°C.

iii. Eutanasia, colección y procesamiento de muestras

A los tiempos indicados, se administró como método de eutanasia una solución de 390 mg/kg de pentobarbital en 0.9% NaCl por inyección intraperitoneal a los ratones. Se extrajo la sangre periférica por punción cardíaca y se recogió en tubos BD Microtainer conteniendo EDTA (BD Bioscience).

Los pulmones y tráqueas fueron removidos asépticamente, recolectados y homogeneizados con en tubos con 1 ml de PBS estéril. Los pulmones fueron pesados antes de ser inmersos en PBS. Se colectaron los lavados nasales haciendo pasar 1 ml de PBS estéril por las narinas del ratón. Adicionalmente, el día 21 post infección se extrajo el tejido linfoide asociado a nasofaringe (NALT), ubicado en la parte posterior del paladar, y se colocó en 1 ml de PBS. Los pulmones fueron homogeneizados con un homogeneizador de vidrio tipo Dounce, mientras que las tráqueas y los NALT fueron homogeneizados con homogeneizador eléctrico.

Recuento bacteriano: Para evaluar la colonización bacteriana en el tracto respiratorio se plaquearon en BGA diluciones seriadas de los homogenatos de pulmón, tráquea y NALT, así como de los lavados nasales y se incubaron por 72 horas a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se realizó el recuento bacteriano y se determinó el número de UFC por órgano.

Análisis hematológico: Se llevó a cabo un análisis hematológico de las muestras de sangre periférica con el equipo Hemavet 950 FS (Drew Scientific).

Preparación de muestras para citometría de flujo: ver siguiente apartado.

b. Citometría de flujo

Utilizando los anticuerpos listados a continuación (Tabla B.5) se identificaron las poblaciones de neutrófilos, macrófagos, células T y células B en pulmón, sangre periférica y lavado nasal.

Tabla B.5. Anticuerpos utilizados para citometría de flujo

Anticuerpo – fluorómetro conjugado	Marca y número de catálogo	Concentración (mg/ml)	Volumen por muestra (µl)
CD11b - BB515	BD Biosciences #564454	0,2	0,2
GR-1 - PE	BD Biosciences #553128	0,2	0,2
F4/80 - PerCPCy5.5	BioLegend #123128	0,2	0,2
B220 - APC Cy7	BD Biosciences #552094	0,2	0,2
CD3e - BV510	BD Biosciences #563024	0,2	0,2
CD45 - PeCF594	BD Biosciences # 562420	0,2	0,2

Preparación de muestras para citometría de flujo

- Pulmón: 500 µl de los homogenatos de pulmón se filtraron con un filtro de 70 µm y se lavaron con 4,5 ml de PBS-FBS-EDTA (PBS 1X, 1% FBS, 5 mM EDTA). Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 1000 xg y se descartó el sobrenadante. El pellet celular se resuspendió en 1 ml de Pharmlyse *Red Blood Cell (RBC) Lysis Buffer* (BD Bioscience) para lisar los glóbulos rojos presentes y se incubó 2 minutos a 37°C antes de ser centrifugado nuevamente. El pellet obtenido se resuspendió en 500 µl de PBS-FBS-EDTA y 100 µl se transfirieron a un nuevo tubo, al cual se le adicionaron 2 µl de Fc Block (BD, #553141) para bloquear los receptores Fc presentes en las muestras y se incubó 15 minutos a 4°C en la oscuridad. A continuación, se agregaron 2 µl del cocktail de los anticuerpos, enumerados en la Tabla B.5, en PBS y se incubaron a 4°C en oscuridad durante 1 hora. Finalizado el tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron a 1000 xg por 5 minutos y se lavaron con 350 µl de PBS-FBS-EDTA para remover el excedente de anticuerpo. Finalmente, las células se resuspendieron en 500 µl de una solución fijadora de 0,4% paraformaldehído y se almacenaron a 4°C y en oscuridad hasta el día siguiente. Finalmente, las muestras se lavaron 2 veces con PBS, se resuspendieron en 300 µl de PBS y se conservaron en heladera hasta que fueron llevadas al citómetro para su análisis.

- Sangre: se transfirieron 500 µl de sangre del tubo BD Microtainer con EDTA a un tubo conteniendo 1 ml de *RBC Lysis Buffer* y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego las muestras se centrifugaron a 1000 xg durante 10 minutos, se lavaron las células dos veces con 1 ml de medio RPMI suplementado con 10% FBS y se resuspendieron en 250 µl de PBS-FBS-EDTA. Se tomaron 100 µl de la suspensión celular y se procedió a hacer el

bloqueo de Fc, tinción y fijación tal como se hizo en las muestras de pulmón. El volumen de PBS agregado al final fue de 300 μ l.

- Lavado nasal: se centrifugaron los lavados nasales a 1000 xg durante 10 minutos, se resuspendieron los pellets en 110 μ l de PBS-FBS-EDTA y 100 μ l se utilizaron para los procesos de bloqueo, tinción y fijación. En este caso, debido a la baja cantidad de células presentes en los lavados nasales, las muestras fueron lavadas solamente una vez después de la fijación y el volumen final fue de 250 μ l.

Las mediciones se realizaron en un citómetro LSR Fortessa (BD) y se analizaron utilizando el software FlowJo v15.

c. Determinación de citoquinas

La concentración de citoquinas presentes en los homogenatos de pulmón se determinó con el kit Meso Scale Discovery V-PLEX Proinflammatory Panel 1 Mouse, que incluye IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, KC/GRO y TNF- α , y con el kit Mouse IL-17 Ultra-Sensitive, siguiendo las indicaciones dadas por el fabricante. Las muestras constaron del sobrenadante de los homogenatos de pulmón obtenido tras una centrifugación a 14000 rpm a 4°C durante 4 minutos y almacenado a -80°C hasta el momento de la determinación.

7. Programas estadísticos y herramientas bioinformáticas

Los gráficos y los análisis estadísticos de los ensayos de formación de biofilm, de movilidad, así como los de los ensayos en ratones fueron realizados con el software GraphPad Prism 6. Comparaciones entre dos grupos fueron analizadas con *unpaired* Student's t-test mientras que las comparaciones entre más grupos con *one-way* ANOVA seguidos con un test de Tukey para múltiples comparaciones.

Para el diseño y visualización de secuencias nucleotídicas se utilizó el programa SnapGene. Para el modelado de estructuras secundarias de proteínas, así como para su visualización se utilizaron Phyre 2.0 y PyMOL, respectivamente (Kelley *et al.*, 2015). Para búsqueda y alineamiento de secuencias nucleotídicas y proteicas se utilizaron BLASTN y BLASTP, respectivamente. Para el alineamiento de múltiples secuencias aminoacídicas se utilizó el software *online* multAlin (F. Corpet, 1988) y se graficó con ESPript 3.0. La búsqueda de dominios en secuencias aminoacídicas se llevó adelante con los softwares *online* ScanProsite o SMART (Schultz *et al.*, 1998; Sigrist *et al.*, 2013). El análisis de interacciones proteína-proteína de los conjuntos de genes diferencialmente expresados entre las cepas se llevó adelante con la plataforma *online* STRING.

Anexo I

1. Medios de cultivo

BGA	
Agar Bordet Gengou	30g/l
Glicerol	10% p/v
Sangre	10% v/v

SS (Stainer-Scholte)	
Glutamato de sodio	570 mM
L-prolina	20 mM
NaCl	530 mM
KH ₂ PO ₄	36 mM
KCL	20 mM
MgCl ₂ .6H ₂ O	5 mM
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,4 mM
Tris-HCl	120 mM
pH	7,20
Agar (cuando fuera necesario)	15 g/l

LB (Lysogeny broth)	
Triptona	10 g/l
NaCl	5 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
Agar (cuando fuera necesario)	15 g/l

Complemento para medio de cultivo SS (1000X)	
L-cisteína	4% p/v
FeSO ₄ .7H ₂ O	1% p/v
Ácido ascórbico	2% p/v
Ácido nicotínico	0,4% p/v
HCl	10% v/v

Complemento para medio de cultivo SS (100X)	
Complemento 100X	1 ml
Glutation reducido	100 mg
Agua destilada	9 ml

Complemento para medio de cultivo SS (100X)	
Complemento 100X	1 ml
Glutation reducido	100 mg
Agua destilada	9 ml

URA3-	
YNB	6,7 g/l

CSM	0,76 g/l
Glucosa	15 g/l
Agar	20 g/l

YPD (Yeast extract-Peptone-Dextrose)

Peptona	20 g/l
Extracto de levadura	10 g/l
Glucosa	20 g/l
Agar (cuando fuera necesario)	15 g/l

2. Soluciones**Soluciones de miniprep****Solución P1**

Tris-HCl	50 mM
EDTA	10 mM
pH	8,00

Solución P2A

NaOH	0,1 mM
------	--------

Solución P2B

SDS	1% p/v
-----	--------

Solución P3

Acetato de potasio	1,5 M
pH	5,5

Suspensión de sílica

Sílica	2,0 g
Agua destilada	15,0 ml

Solución de lavado de sílica 10X

NaCl	50 mM
Tris-HCl	10 mM
EDTA	2,5 mM
Etanol	50% v/v
pH	7,5

Solución de lavado de sílica 1X

Solución de lavado 10X	10% v/v
Etanol	50% v/v

Solución de extracción de RNA

EDTA	18 mM
SDS	0,025% p/v
β -mercaptoetanol	1% v/v
Formamida	95% v/v

Solución de Coomassie Blue R250

Coomassie R250	0,2% p/v
Metanol	40% v/v
Ácido acético	20% v/v

Solución decolorante para Coomassie Blue

Metanol	40% v/v
Ácido acético	10% v/v

Lazy Bones

Polietilenglicol (PM 3350)	40% v/v
Acetato de litio	0,1 M
Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 M
pH	7,5

3. Buffers**Buffer fosfato PBS**

KH ₂ PO ₄	0,428 g/l
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	3,5 g/l
NaCl	7,2 g/l

Buffer TE

Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM
pH	8,00

Buffer TBE (10X)

Tris	89 mM
Na ₂ EDTA	2,5 mM
H ₃ BO ₃	89 mM
pH	8,2

Buffer TBS (Tris-Sodio)

Tris-HCl	0,5 M
NaCl	1,5 mM

Buffer de transferencia para Western blot

Glicina	1,0 M
Metanol	20% v/v
Tris-HCl	0,025 M

Buffer de corrida para SDS-PAGE

Tris-HCl	50 mM, pH 8,3
Glicina	370 mM
SDS	10% p/v

Buffer Laemmli 4X	
Tris-HCl	200 mM, pH 6,8
Glicerol	40% v/v
SDS	8% p/v
Na ₂ EDTA	0,8 M
Azul bromofenol	0,08% p/v
β-mercaptoetanol	5% v/v

Buffer LapA	
Tris	20 mM
MgCl ₂	10 mM
pH	8,0

Anexo II

1. Primers

Nombre	Secuencia (5'-->3')	Uso	Referencia
F1bvgRF	CTGTTTTATCAGACCGCTTCTGCGTTCTTGCCCGGTATCAACG	Delección de <i>bvgR</i>	Este trabajo
F1BvgRR	TCCATGATCCACTGGATAAAGGTCCGCGCAA	Delección de <i>bvgR</i>	Este trabajo
F2BvgRF	TTGCGCGGACCTTATCCAGTGATCATGGA	Delección de <i>bvgR</i>	Este trabajo
F2BvgRR	CAATTCACACAGGAAACAGCTATGATCGACATCCGTA	Delección de <i>bvgR</i>	Este trabajo
BvgR Total Fw	CTGGGCTGCGGCGTTAC	Amplificación de <i>bvgR</i> con promotor propio	
BvgR Total Rv	CCGAAATCGACGGCATGGTA	Amplificación de <i>bvgR</i> con promotor propio	
F1 BB1564 Fw	<u>GTTTTATCAGACCGCTTCTGCGTTCTGATTTGAAGCCGAAAAACAGAC</u>	Delección de <i>bb1564</i>	Este trabajo
F1 BB1564 Rv	AGAGGCGGGTCAGCCCTGTGGAGCCATGCGGCAGG	Delección de <i>bb1564</i>	Este trabajo
F2 BB1564 Fw	CCTGCCGATGGTCCACAGGGCTGACCCGCTCT	Delección de <i>bb1564</i>	Este trabajo
F2 BB1564 Rv	<u>CAATTCACACAGGAAACAGCTATAGGGTGTAGCTGGACACTGC</u>	Delección de <i>bb1564</i>	Este trabajo
mut3128 1F	CTGTTTTATCAGACCGCTTCTGCGTTCTGATTTATAACAAGCCCGCAGGGG	Delección de <i>bb3128</i>	Este trabajo
mut3128 1R	CGTGCGGATGGACAACATTGGGCAACATCGCACTCGAATC	Delección de <i>bb3128</i>	Este trabajo
mut3128 2F	GATTCGAGTCCGATGTTGCCCAATGTTGCCATCGCCACG	Delección de <i>bb3128</i>	Este trabajo
mut3128 2R	CGGATAACAATTCACACAGGAAACAGCTATGGCAGCTTCGGCATTCCATT	Delección de <i>bb3128</i>	Este trabajo
M13Fw-40	gtttcccagtcacgac	Chequeo de construcciones en pBBR1MCS-5	
M13Rv-40	caggaaacagctatgac	Chequeo de construcciones en pBBR1MCS-5	
Q30Verify F	GAGTCAGTGAGCGAGGAAG	Chequeo de construcciones en PMQ30	
Q30Verify R	CAGACCGCTTCTGCGTTCTG	Chequeo de construcciones en PMQ30	
KpnI E2Crimson Fw	ctagGGTACCATGGATAGCACTGAGAACGTcatc	Amplificación de <i>e2crimson</i> con extremos KpnI-StuI	Este trabajo
StuI E2Crimson Rv	ctagAGGCCTTACAATTGTCGTGCTTGTAcaattcg	Amplificación de <i>e2crimson</i> con extremos KpnI-StuI	Este trabajo
HindIII PbvGA Fw	ctag <u>AAGCTT</u> ATTCCGACCAGCGAAGTGAAG	Amplificación de <i>pbvGA</i> con extremos HindIII-KpnI	Este trabajo
KpnI PbvGA Rv	ctag <u>GGTACC</u> GATAAGAAGAATATGCTTTGAGTTTCGTGGC	Amplificación de <i>pbvGA</i> con	Este trabajo

		extremos HindIII-KpnI	
KpnI PflaA Fw	ctagGGTACCGTTGAGGCTCCCAAGAGAGAAAG	Amplificación de <i>pflaA</i> con extremos HindIII-KpnI	Este trabajo
HindIII PflaA Rv	ctagAAGCTTGCGCATGCCATGGCC	Amplificación de <i>pflaA</i> con extremos HindIII-KpnI	Este trabajo
pGflip Seq Fw	CAGGGGATCTTGAAGTTCCTATTCCG	Chequeo de construccione s en pGFLIP	Este trabajo
pGflip Seq Rv	GGGTGTAGCGTCGTAAGCTAATACG	Chequeo de construccione s en pGFLIP	Este trabajo
flaA Fw	GACCTTGATGCCGTTGAAGT	qRT-PCR (<i>flaA</i>)	Este trabajo
flaA Rv	CGCTGAACGAAATCAACAAC	qRT-PCR (<i>flaA</i>)	Este trabajo
BB1617 Fw	TAAAGGGGATGCTGGATACG	qRT-PCR (<i>bsp22</i>)	Este trabajo
BB1617 Rv	TAGCGCATGTTGTTGGTGAT	qRT-PCR (<i>bsp22</i>)	Este trabajo
BB2303 Fw	AGGATTACAACGCGATCCTG	qRT-PCR (<i>bipA</i>)	Este trabajo
BB2303 Rv	CAGCTCACCTGATGTCGTA	qRT-PCR (<i>bipA</i>)	Este trabajo
vrg6 BB3906 Fw	GCCGATGGCCCTTGTAGTAG	qRT-PCR (<i>vrg6</i>)	Este trabajo
vrg6 Rv	GTGGATATCGGGGTGTCGAT	qRT-PCR (<i>vrg6</i>)	Este trabajo

Anexo III

1. Genes diferencialmente expresados entre *BbWT* y *BbbvgR* (RNA-seq)Tabla C.1 Genes con mayor expresión en *BbbvgR* que en *BbWT*

Genes	Fold change	P-value	Anotación
<i>flhC</i>	73.4469124	4.0134E-46	Flagellar transcriptional regulator FlhC
<i>flgC</i>	71.5360554	7.0789E-44	Flagellar basal-body rod protein FlgC
<i>flgB</i>	95.4347369	5.4769E-42	Flagellar basal body rod protein FlgB
<i>flgG</i>	43.9354263	6.452E-41	Flagellar basal-body rod protein FlgG
<i>flgE</i>	42.0085253	1.0104E-40	Flagellar hook protein FlgE
<i>fliF</i>	36.4961365	1.6235E-37	Flagellar M-ring protein
<i>flgD</i>	69.6306954	2.1477E-37	Basal-body rod modification protein FlgD
<i>cheW</i>	27.380489	5.127E-36	Chemotaxis protein CheW
<i>flhD</i>	96.8129226	3.6376E-35	Flagellar transcriptional regulator FlhD
<i>cheY_1</i>	23.4571193	3.4508E-33	
<i>motB</i>	40.5526177	1.7019E-31	Chemotaxis protein MotB
<i>fliD</i>	30.289744	1.1433E-30	Flagellar hook-associated protein 2 (Flagellar cap protein)
<i>flgK</i>	31.7304568	8.0082E-30	Flagellar hook-associated protein 1
<i>tsr_1</i>	24.3771369	1.4378E-29	Methyl-accepting chemotaxis protein I
<i>fliE</i>	82.6457842	3.6191E-28	Flagellar hook-basal body complex protein FlIE
<i>motA</i>	39.2061139	4.2349E-28	Chemotaxis protein MotA
<i>cheA</i>	24.7059772	6.1907E-28	Chemotaxis protein CheA
<i>fliG</i>	35.3219516	1.5003E-27	Flagellar motor switch protein FlIG
<i>flaA</i>	15.841273	1.9641E-27	Flagellin
<i>BB3106</i>	12.6625835	3.1862E-27	
<i>cheY_2</i>	11.2840443	5.1195E-25	

<i>BB2323</i>	8.8096286	1.8588E-22	Putative transcriptional regulator
<i>flgF</i>	28.9285146	2.2524E-22	Flagellar basal body protein
<i>flgH</i>	35.7891055	7.7065E-22	Flagellar L-ring protein
<i>cheB</i>	14.0468607	2.8328E-21	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methyltransferase
<i>fliS</i>	15.2413634	7.7462E-21	Flagellar protein FliS
<i>fliM</i>	11.1862233	2.1668E-20	Flagellar motor switch protein FliM
<i>fliL</i>	12.4277496	2.9981E-20	Flagellar protein FliL
<i>fliH</i>	29.9542918	1.1424E-19	Flagellar assembly protein FliH
<i>flgJ</i>	47.5695612	3.6194E-19	Peptidoglycan hydrolase
<i>BB2573</i>	17.4674601	5.8334E-18	Putative lipoprotein
<i>fliT</i>	13.7303665	3.4401E-17	
<i>flgI</i>	24.0352675	2.6537E-16	Flagellar P-ring protein
<i>flgL</i>	26.7714506	2.0814E-15	Flagellar hook-associated protein 3
<i>cheR</i>	13.0067789	1.5014E-13	Chemotaxis protein methyltransferase
<i>fliA</i>	11.1142842	4.6913E-12	RNA polymerase sigma factor FliA (RNA polymerase sigma factor for flagellar operon)
<i>BB2322</i>	5.61852676	6.8238E-12	BRCT domain sin GO term prediction
<i>flhB</i>	16.3810617	1.9957E-11	Flagellar biosynthetic protein FlhB
<i>BB2590</i>	31.2513777	2.2719E-11	
<i>fliI</i>	15.5207322	2.3801E-11	Flagellum-specific ATP synthase FliI
<i>flgA</i>	5.34155243	2.4835E-11	Flagella basal body P-ring formation protein FlgA
<i>BB4451</i>	4.10006534	3.9358E-11	BP3834
<i>BB2556</i>	4.88706231	6.9653E-11	Uncharacterized protein
<i>flhA</i>	14.5501598	7.1132E-11	Flagellar biosynthesis protein FlhA
<i>fliK</i>	24.2833113	8.538E-11	
<i>BB3115</i>	7.63036932	1.9993E-10	Probable methyl-accepting chemotaxis protein
<i>fliO</i>	7.51734541	5.3221E-10	Flagellar protein

<i>BB1191</i>	4.47814736	7.2337E-10	Putative outer membrane protein LapE
<i>fliJ</i>	29.3350302	1.1997E-09	Flagellar protein FliJ
<i>tsr_2</i>	8.27033743	1.2218E-09	
<i>BB2002</i>	3.43191961	1.2338E-09	Putative membrane protein
<i>BB3923</i>	4.65088338	1.3635E-09	Uncharacterized protein
<i>fliN</i>	9.23999673	1.7594E-09	Flagellar motor switch protein
<i>BB0163</i>	3.42185697	3.0968E-09	Putative integral membrane protein
<i>BB4486</i>	3.4836405	3.6507E-09	GntR family transcriptional regulator
<i>BB1849</i>	3.40804416	5.1074E-09	
<i>BB0484A</i>	3.91366063	5.2167E-09	
<i>cheZ</i>	9.1902709	5.841E-09	Protein phosphatase CheZ
<i>BB0920</i>	3.19338345	1.6897E-08	Putative membrane protein
<i>BB4134</i>	2.98871182	3.3347E-08	
<i>BB1208</i>	3.18185228	6.157E-08	Methyl-accepting chemotaxis protein
<i>tar_1</i>	15.264379	1.4153E-07	
<i>BB0165</i>	3.01891016	1.7645E-07	
<i>BB1962</i>	4.06349553	2.1326E-07	
<i>flgM</i>	3.17164297	2.4112E-07	Negative regulator of flagellin synthesis
<i>BB1963</i>	3.42351304	2.5304E-07	
<i>tar_2</i>	12.9828346	8.4875E-07	
<i>BB4921</i>	5.51479121	9.0792E-07	
<i>BB0164</i>	2.62579712	9.2736E-07	Probable ATP-binding component of ABC transporter
<i>BB0907</i>	2.70673653	1.2325E-06	
<i>BB2324</i>	2.91750446	2.2745E-06	
<i>BB2790</i>	2.88898584	3.4067E-06	Uncharacterized protein GGDEF
<i>acoD</i>	3.53583722	5.1536E-06	Aldehyde dehydrogenase
<i>BB2128</i>	2.47414147	8.8675E-06	Probable ATP-binding component of ABC transporter

<i>BB2591</i>	6.31485622	1.1774E-05	Putative flagellar protein
<i>BB0166</i>	2.5627001	1.4248E-05	
<i>BB1928</i>	2.80379511	2.1156E-05	
<i>BB2109</i>	2.4584536	2.5688E-05	Probable two-component histidine kinase. EAL/GGDEF
<i>BB2462</i>	2.988556	3.1604E-05	Putative lipoprotein
<i>BB2108</i>	3.234082	3.4314E-05	Probable two-component response regulator
<i>flaG</i>	3.45685574	3.6206E-05	
<i>BB0484</i>	2.57842506	4.0969E-05	Uncharacterized protein
<i>fliP</i>	3.8465942	4.1642E-05	Flagellar biosynthetic protein FliP
<i>BB1190</i>	4.69217582	4.6877E-05	
<i>BB2127</i>	2.46388153	4.9009E-05	Putative permease component of ABC transporter
<i>BB1413</i>	2.52640606	7.2578E-05	Putative membrane protein
<i>BB3968</i>	2.51142838	7.8452E-05	
<i>BB2129</i>	2.65361287	9.2738E-05	
<i>BB2740</i>	2.45731453	0.00010647	Response regulatory protein
<i>BB0908</i>	2.58534021	0.00010755	Putative helicase
<i>BB4136</i>	2.6908085	0.00014427	
<i>BB1561</i>	2.28861021	0.00014453	PilZ
<i>BB2016</i>	2.46442632	0.00017345	Putative cold-shock protein
<i>BB4135</i>	2.52130695	0.0002291	
<i>BB0485</i>	2.71530709	0.00023762	
<i>BB2013</i>	2.31355704	0.00024908	
<i>BB3032</i>	2.40246662	0.00028949	Putative exported protein
<i>BB0911</i>	2.47684162	0.00040195	Putative serine protease
<i>BB4410</i>	2.12543396	0.00052625	
<i>BB0020</i>	2.06052868	0.00054591	Probable two-component response regulator
<i>BB3114</i>	2.45989727	0.00058326	Putative membrane protein GGDEF
<i>BB0909</i>	2.36588377	0.00062092	

<i>BB1364</i>	1.92072106	0.00072013	Probable D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase
<i>BB0483</i>	2.03977499	0.00080284	
<i>BB3012</i>	6.63245591	0.00094961	Putative exported protein
<i>BB2656</i>	2.54560809	0.00096	Putative cytochrome
<i>BB0523</i>	2.08288799	0.00115301	Putative ferredoxin
<i>BB3421</i>	1.98620466	0.00129088	Putative periplasmic substrate-binding transport protein
<i>flhF</i>	7.11310465	0.00133589	Flagellar biosynthesis protein
<i>BB0520</i>	2.19577313	0.0014564	Putative membrane protein
<i>BB1957</i>	1.84969671	0.00186243	
<i>BB1338</i>	2.21972386	0.00196768	
<i>BB1564</i>	4.71684566	0.00265418	Putative exported protein HD-GYP
<i>bllY</i>	2.30512279	0.002703	Putative hemolysin
<i>hfq</i>	2.1419752	0.0027877	RNA-binding protein Hfq
<i>BB3482A</i>	1.95043705	0.00281098	Uncharacterized protein/phage related
<i>BB0444</i>	1.99945861	0.0028889	Putative exported protein
<i>BB1339</i>	2.06707015	0.00294704	
<i>BB4358</i>	1.9848255	0.00296367	Putative exported solute binding protein
<i>BB0521</i>	2.01905648	0.00315491	Integral membrane protein
<i>BB0525</i>	1.8228811	0.00384115	Uncharacterized protein
<i>sphB3</i>	2.98579747	0.004056	Serine protease
<i>BB0912</i>	2.10947268	0.00416102	Type III restriction-modification system methyltransferase
<i>BB0471</i>	1.97839852	0.00463394	
<i>BB0655</i>	2.50607735	0.00471134	Putative transcriptional regulator
<i>BB1414</i>	1.98020371	0.00474152	Putative membrane protein
<i>BB3053</i>	1.78525947	0.00509815	Putative exported protein
<i>greA</i>	2.13546074	0.00514254	Transcription elongation factor GreA
<i>BB1994</i>	2.37518399	0.00527278	

<i>BB0913</i>	1.96374691	0.0052739	Type III restriction enzyme
<i>BB3729</i>	1.90086889	0.00534415	
<i>glnP</i>	2.12804305	0.00534936	Glutamine transport system permease protein
<i>BB3857</i>	1.80528423	0.00541383	Putative transcriptional regulator
<i>cspA_2</i>	2.16484417	0.00550038	
<i>BB4440</i>	2.03319308	0.00564696	
<i>BB2735</i>	1.7294593	0.00623602	
<i>BB0219</i>	1.93211265	0.00715348	Putative glycosyl transferase
<i>BB3065</i>	1.98252572	0.00776208	Uncharacterized protein
<i>BB1453</i>	2.2014192	0.007837	
<i>fabE</i>	1.88658098	0.00793011	Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase
<i>BB3405</i>	2.06608276	0.00835151	Probable Fe(2+)-trafficking protein
<i>BB0519</i>	2.02282991	0.0088644	Putative exported protein
<i>BB2227</i>	1.95266903	0.00899465	phage related
<i>BB3522</i>	1.9053144	0.00913803	Putative phage repressor
<i>coaE</i>	1.70902999	0.00942311	Dephospho-CoA kinase
<i>BB0910</i>	1.99356068	0.00972529	Putative ATPase
<i>BB4613</i>	2.39301782	0.00974156	BP3280/ vrg-73
<i>BB2736</i>	2.00763252	0.01000953	Putative arylsulfatase protein
<i>ugpA</i>	1.79751346	0.010852	sn-glycerol-3-phosphate transport system, permease protein
<i>flir</i>	6.27525626	0.01180208	Flagellar biosynthetic protein FLIR
<i>BB3643</i>	1.70356042	0.01260457	BP3643 phage related
<i>BB0089</i>	1.90100894	0.01305618	
<i>ugpE</i>	1.70695086	0.01362775	sn-glycerol-3-phosphate transport system permease protein UgpE
<i>BB3692</i>	2.02481876	0.01363248	
<i>BB0774</i>	2.09429506	0.0137132	Uncharacterized protein
<i>BB3074</i>	1.62980735	0.01515374	Uncharacterized protein
<i>BB1835</i>	1.81509413	0.01551027	

<i>BB1290</i>	2.13430772	0.01559611	
<i>BB0821</i>	1.97089952	0.01693783	Autotransporter
<i>BB3063</i>	2.06090658	0.01721614	Putative exported protein
<i>BB1180</i>	2.68042179	0.01743911	Probable cation-transporting ATPase
<i>BB2743</i>	1.76723756	0.01771076	
<i>BB2871</i>	1.71825238	0.01790906	
<i>rpoZ</i>	1.82040258	0.01793238	DNA-directed RNA polymerase subunit omega
<i>BB4818</i>	1.79911211	0.01821839	
<i>BB3916</i>	1.93688559	0.01859701	Putative integral membrane protein
<i>BB2575</i>	2.7056348	0.01946571	Methyl-accepting chemotaxis protein
<i>BB1650</i>	1.8179845	0.01947034	
<i>BB0360</i>	1.64563775	0.01947123	Transcriptional regulator
<i>BB3054</i>	1.64472335	0.01949355	Putative integral membrane protein
<i>BB4932</i>	1.91011131	0.02023731	Sugar ABC transporter, ATP-binding protein
<i>BB0196</i>	1.62915403	0.02126113	
<i>BB0167</i>	1.60162245	0.02131907	
<i>aceA</i>	1.8333194	0.02200788	Putative isocitrate lyase
<i>BB3904</i>	1.69889098	0.02226764	
<i>BB0842</i>	1.58098713	0.02330843	Iron-sulfur cluster carrier protein
<i>BB2893</i>	1.62285284	0.0235743	
<i>BB3064</i>	1.93605269	0.02377703	
<i>fadD2</i>	1.5670023	0.02415732	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase
<i>pdxK</i>	1.55132549	0.02534445	Pyridoxine/pyridoxal/pyridoxamine kinase
<i>BB0019</i>	1.66456343	0.02547514	
<i>BB3128</i>	1.65260013	0.026444	Putative membrane protein. EAL
<i>cspA_1</i>	2.00730414	0.02646456	

<i>BB2160</i>	1.83406797	0.02693887	Putative extracellular solute-binding protein
<i>BB4968</i>	1.57571913	0.02739828	AsnC-family transcriptional regulator
<i>BB2946</i>	2.01094623	0.02772609	Putative iron binding protein
<i>BB3566</i>	2.14077015	0.0281435	
<i>BB0514</i>	1.88164149	0.02913034	Putative exported protein
<i>BB1247</i>	1.57095827	0.02919267	Putative hydrolase
<i>BB2947</i>	1.77708494	0.02942053	Putative inner membrane component of binding-protein-dependent transport system
<i>BB2490</i>	1.59364325	0.02942211	phage related
<i>BB3609</i>	2.26827527	0.03074668	phage related
<i>BB2662</i>	1.57494839	0.03095133	
<i>BB5004</i>	1.54718116	0.03104711	Putative extracellular solute-binding protein
<i>BB0524</i>	1.75424115	0.0311632	
<i>BB0379</i>	1.54113125	0.03273724	Transcriptional regulatory protein
<i>BB1185</i>	1.91990747	0.03368048	LapG
<i>BB3564</i>	2.20594934	0.0341988	Probable inner membrane component of binding-protein-dependent transport system
<i>BB3033</i>	2.02664086	0.0341988	Putative membrane protein
<i>fdsG</i>	2.39146408	0.03619227	NAD-dependent formate dehydrogenase gamma subunit
<i>rpsU</i>	1.69266274	0.03701245	30S ribosomal protein S21
<i>BB3352</i>	1.68834068	0.03727501	
<i>BB4137</i>	2.07868807	0.03746832	Uncharacterized protein
<i>bph3</i>	1.70596201	0.0376944	Putative DNA-binding protein (Histone)
<i>prpE</i>	1.51105634	0.03782217	Propionate--CoA ligase
<i>BB1821</i>	1.68396004	0.03820577	Putative membrane protein
<i>tonB</i>	1.86000049	0.03826878	Protein TonB
<i>leuA_2</i>	1.76890424	0.03883686	
<i>BB3557</i>	1.51526205	0.04122895	Uncharacterized protein

<i>BB2663</i>	1.63760736	0.04160469	Putative membrane protein
<i>BB3304</i>	1.79844773	0.0421806	
<i>BB1293</i>	1.89761095	0.04271594	
<i>BB3280</i>	2.00369052	0.04318952	
<i>BB3279</i>	2.68679586	0.04378518	Putative membrane protein
<i>petA</i>	1.61179406	0.0451625	Ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit
<i>BB3011</i>	1.84374744	0.04534419	Putative glutaredoxin
<i>BB2018</i>	1.53624297	0.04719295	Putative exported protein
<i>BB0473</i>	1.53808235	0.04833665	Probable LysR-family transcriptional regulator
<i>BB1727</i>	1.74620465	0.04918968	Putative exported protein
<i>BB0748</i>	3.00114731	0.04940765	
<i>BB1997</i>	1.56851873	0.04956954	Putative malate dehydrogenase

Tabla C.2. Genes con menor expresión en *BbbvgR* que en *BbWT*

Genes	Fold change	P-value	Anotación
<i>BB4967</i>	-6.4051217	7.0473E-06	Acetolactate synthase
<i>BB2406</i>	-2.6798894	9.8027E-05	Putative lipoprotein
<i>BB4022</i>	-2.4491176	0.00014929	Probable hydrolase
<i>fim2</i>	-3.0591631	0.00022582	Serotype 2 fimbrial subunit
<i>bsp22</i>	-2.7571161	0.00029674	T3SS effector
<i>prlC</i>	-3.3606643	0.00035009	Oligopeptidase A
<i>htpG</i>	-3.1447515	0.00040077	Chaperone protein HtpG (Heat shock protein HtpG)
<i>BB1618</i>	-2.4462267	0.00062053	chaperone btc22 for bsp22
<i>BB2504</i>	-7.4044169	0.00063247	Putative membrane transport ATPase
<i>bcrH1</i>	-2.5933765	0.00082626	Putative regulatory protein
<i>BB1614</i>	-1.9958732	0.00098696	
<i>dnaK</i>	-3.6181081	0.00203047	Chaperone protein DnaK
<i>dnaJ</i>	-2.4163921	0.00219158	Chaperone protein DnaJ
<i>bopB</i>	-2.3138199	0.00225909	Putative outer protein B
<i>ureE</i>	-1.8587865	0.00231082	Urease accessory protein UreE
<i>BB1604</i>	-2.2484823	0.00246827	Putative exported protein
<i>bipA</i>	-1.8633167	0.00296555	Putative outer membrane ligand binding protein
<i>BB4834</i>	-1.7646597	0.00351157	
<i>gbd</i>	-2.854203	0.00379736	NAD-dependent 4- hydroxybutyrate dehydrogenase
<i>BB1615</i>	-2.003687	0.00390694	Uncharacterized protein
<i>ackA</i>	-3.2855765	0.00448466	Acetate kinase
<i>BB3935</i>	-2.9065691	0.0058915	
<i>BB1956</i>	-1.9063604	0.00620914	
<i>bscK</i>	-1.9205489	0.00655371	Uncharacterized protein
<i>bopN</i>	-2.050611	0.00675886	Putative outer protein N
<i>BB1643</i>	-1.7611338	0.00679922	Putative inner membrane transport protein
<i>bopD</i>	-2.0370428	0.00681295	

<i>bscI</i>	-2.0442713	0.00682853	Lipoprotein
<i>bcrH2</i>	-2.046971	0.00683676	Putative regulatory protein
<i>BB3217</i>	-1.8662617	0.00728076	
<i>fimX</i>	-2.8923202	0.00754494	Fimbrial protein
<i>hslU</i>	-2.2965871	0.00771606	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
<i>bcr4</i>	-1.9546003	0.00803388	
<i>BB2883</i>	-2.0111858	0.00857863	Uncharacterized protein
<i>BB3158</i>	-2.0003343	0.00939302	
<i>BB3936</i>	-2.7005258	0.01101159	putative GrpE chaperone
<i>fabI_1</i>	-2.4636887	0.01116015	
<i>BB3976</i>	-3.2521102	0.01169466	
<i>BB4109</i>	-1.8401148	0.0127124	
<i>BB1955</i>	-1.7587232	0.0128142	Putative integral membrane protein
<i>BB3366</i>	-1.7967289	0.01313159	Putative ABC-transporter ATP-binding protein
<i>BB1057</i>	-1.7596824	0.01556143	
<i>alr</i>	-1.7556674	0.01591202	Alanine racemase
<i>BB1385</i>	-3.2076768	0.01596066	Phosphate acetyl/butaryl transferase
<i>BB3102</i>	-1.7564004	0.01656597	Probable oxidoreductase
<i>BB4455</i>	-1.7757681	0.01714115	UbiE/COQ5 methyltransferase family protein
<i>BB4288</i>	-1.9250266	0.01831279	
<i>BB4264</i>	-1.7781829	0.01855718	Putative membrane protein
<i>ddlB</i>	-1.7744276	0.01934453	
<i>BB3101</i>	-1.6851318	0.02057139	Putative oxidoreductase
<i>bscL</i>	-1.8849422	0.02065423	Putative type III secretion protein
<i>catD2</i>	-1.8117899	0.0216782	3-oxoadipate enol-lactone hydrolase
<i>BB3156</i>	-1.6646139	0.02213354	
<i>BB1598</i>	-1.6785492	0.0224838	Putative glutamyltransferase
<i>BB5009</i>	-3.8125522	0.02374745	Putative exported protein
<i>ureJ</i>	-1.7593957	0.02376279	Urease accessory protein

<i>BB1169</i>	-2.0250049	0.02383569	Putative AsnC-family transcriptional regulator
<i>BB4145</i>	-1.9893032	0.02478731	
<i>BB3479</i>	-1.6403244	0.02498114	
<i>hslV</i>	-2.0338428	0.02505495	ATP-dependent protease subunit HslV
<i>zraR</i>	-1.7843734	0.02751526	Putative transcriptional regulatory protein
<i>BB1967</i>	-1.626476	0.0275995	
<i>BB3249</i>	-1.519024	0.02806653	Pseudouridine synthase
<i>bscN</i>	-1.8063998	0.02837848	Putative ATP synthase in type III secretion system
<i>BB0582</i>	-1.5429499	0.02867596	
<i>hemL</i>	-1.5257288	0.02906099	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase (GSA)
<i>BB0918</i>	-1.7279688	0.02928599	Putative exported protein
<i>wbmE</i>	-1.6493369	0.02952449	
<i>ectC</i>	-1.7901543	0.02982161	L-ectoine synthase
<i>BB1186</i>	-1.9821626	0.03031688	Putative hemolysin. BrtA
<i>lon_1</i>	-2.2378611	0.03061043	
<i>bscI</i>	-1.79852	0.03079598	Putative type III secretion protein
<i>atpC</i>	-1.6491902	0.03331207	ATP synthase epsilon chain
<i>BB1124</i>	-1.5874576	0.03450203	Putative enoyl-CoA hydratase/isomerase
<i>BB1947</i>	-2.1012915	0.03467414	Putative hydrolase
<i>BB4029</i>	-1.77312	0.0351373	Putative glycosyl transferase
<i>BB1176</i>	-1.8127905	0.03570596	
<i>BB0424</i>	-1.5914713	0.03635482	Putative regulatory protein
<i>BB1651</i>	-1.5456469	0.03645911	
<i>BB3157</i>	-1.6562515	0.03729575	
<i>atpD</i>	-1.7275841	0.03791256	ATP synthase subunit beta
<i>ttrA</i>	-3.8074867	0.03797266	Tetrathionate reductase subunit A
<i>BB1304</i>	-1.4996171	0.03879522	
<i>ectB</i>	-1.664704	0.03913841	Diaminobutyrate--2-oxoglutarate transaminase
<i>BB3287</i>	-1.5950856	0.04121412	
<i>BB1170</i>	-2.8671925	0.0415903	Uncharacterized protein

<i>BB0117</i>	-1.5748701	0.04386987	
<i>BB1602</i>	-1.8946124	0.04440742	
<i>BB0305</i>	-1.6320511	0.04462704	
<i>psd</i>	-1.6545946	0.04556029	Phosphatidylserine decarboxylase proenzyme
<i>oplaH</i>	-3.4398831	0.04716172	5-oxoprolinase
<i>BB1386</i>	-2.6558231	0.04731113	
<i>BB1989</i>	-1.6553743	0.04753542	
<i>BB1836</i>	-2.334559	0.04817852	
<i>bfr</i>	-1.6479248	0.04838036	Bacterioferritin
<i>BB4153</i>	-1.466337	0.0492695	Putative hydrolase
<i>norM_2</i>	-2.1113867	0.04964977	
<i>BB4045</i>	-1.5746954	0.04993795	

Tabla C.3. Genes regulados por BvgR, pero no por el sistema BvgAS

Expresión aumentada en <i>BbbvgR</i> ⁻	Expresión disminuída en <i>BbbvgR</i> ⁻
BB0163	BB0117
BB0164	BB0424
BB0166	BB0582
BB0167	BB1057
BB0196	BB1124
BB0473	BB1170
BB0484	BB1304
BB0519	BB1598
BB0520	BB1955
BB0521	BB2883
BB0523	BB3249
BB0524	BB3366
BB0525	BB3479
BB0821	BB3936
BB0842	BB4022
BB0909	BB4045
BB0910	BB4145
BB0911	BB4153
BB0912	BB4264
BB0913	BB4455
BB1180	BB5009
BB1247	catD2
BB1364	ddlB
BB1453	dnaJ
BB1564	dnaK

BB2013	hslU
BB2129	hslV
BB2160	lon_1
BB2227	oplaH
BB2462	prlC
BB2490	ttrA
BB2656	ureJ
BB2662	zraR
BB2663	
BB2735	
BB2743	
BB2946	
BB2947	
BB3011	
BB3012	
BB3074	
BB3128	
BB3279	
BB3280	
BB3352	
BB3405	
BB3482A	
BB3557	
BB3564	
BB3566	
BB3609	
BB3643	

BB3968

BB4137

BB4968

aceA

bIIY

fadD2

fdsG

prpE

rpoZ

rpsU

tonB

ugpE

Bibliografía

Bibliografía

- Abe, A., Nagamatsu, K. and Watanabe, M. (2008) 'The Bordetella type III secretion system: Its application to vaccine development', *Microbiology and Immunology*. Microbiol Immunol, pp. 128–133. doi: 10.1111/j.1348-0421.2008.00028.x.
- Abe, H. *et al.* (2015) 'Detection of genes expressed in Bordetella bronchiseptica colonizing rat trachea by in vivo expressed-tag immunoprecipitation method', *Microbiology and Immunology*. Blackwell Publishing Asia, 59(5), pp. 249–261. doi: 10.1111/1348-0421.12247.
- Ahuja, U. *et al.* (2016) 'Differential regulation of type III secretion and virulence genes in Bordetella pertussis and Bordetella bronchiseptica by a secreted anti- σ factor.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(9), pp. 2341–8. doi: 10.1073/pnas.1600320113.
- Akerley, B. J. *et al.* (1992) 'The bvgAS locus negatively controls motility and synthesis of flagella in Bordetella bronchiseptica.', *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology (ASM), 174(3), pp. 980–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1370665> (Accessed: 5 July 2018).
- Akerley, B. J., Cotter, P. A. and Miller, J. F. (1995) *Ectopic Expression of the Flagellar Regulon Alters Development of the Bordetella-Host Interaction, Cell*.
- Akerley, B. J. and Miller, J. F. (1993) 'Flagellin gene transcription in Bordetella bronchiseptica is regulated by the BvgAS virulence control system', *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology (ASM), 175(11), pp. 3468–3479. doi: 10.1128/jb.175.11.3468-3479.1993.
- Alvarez Hayes, J. *et al.* (2020) 'Hfq modulates global protein pattern and stress response in Bordetella pertussis', *Journal of Proteomics*. Elsevier B.V., 211. doi: 10.1016/j.jprot.2019.103559.
- Ambrosis, N. *et al.* (2016) 'Homologs of the LapD-LapG c-di-GMP effector system control biofilm formation by Bordetella bronchiseptica', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 11(7), p. e0158752. doi: 10.1371/journal.pone.0158752.
- Ambrosis, N. (2018) *Analisis del rol de proteínas tipo Lap en la formación de biofilm de Bordetella bronchiseptica*.
- Ambrosis, N., Fernández, J. and Sisti, F. (2020) 'Counter-Selection Method for Markerless Allelic Exchange in Bordetella bronchiseptica Based on sacB Gene From Bacillus subtilis', *Current protocols in microbiology*. NLM (Medline), 59(1), p. e125. doi: 10.1002/cpmc.125.
- Armstrong, S. K., Brickman, T. J. and Suhadolc, R. J. (2012) 'Involvement of multiple distinct Bordetella receptor proteins in the utilization of iron liberated from transferrin by host catecholamine stress hormones', *Molecular Microbiology*. Mol Microbiol, 84(3), pp. 446–462. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08032.x.
- Banemann, A., Deppisch, H. and Gross, R. (1998) 'The lipopolysaccharide of Bordetella bronchiseptica acts as a protective shield against antimicrobial peptides', *Infection and Immunity*. American Society for Microbiology, 66(12), pp. 5607–5612. doi: 10.1128/iai.66.12.5607-5612.1998.
- Barbier, M. *et al.* (2017) 'Modulation of pertussis and adenylate cyclase toxins by sigma factor

- RpoE in *Bordetella pertussis*', *Infection and Immunity*. American Society for Microbiology, 85(1). doi: 10.1128/IAI.00565-16.
- Bassinot, L. *et al.* (2004) 'Bordetella pertussis adenylate cyclase-hemolysin induces interleukin-6 secretion by human tracheal epithelial cells', *Infection and Immunity*. American Society for Microbiology (ASM), 72(9), pp. 5530–5533. doi: 10.1128/IAI.72.9.5530-5533.2004.
- Beattie, D. T., Mahan, M. J. and Mekalanos, J. J. (1993) 'Repressor binding to a regulatory site in the DNA coding sequence is sufficient to confer transcriptional regulation of the vir-repressed genes (vrg genes) in *Bordetella pertussis*', *Journal of Bacteriology*, 175(2), pp. 519–527. doi: 10.1128/jb.175.2.519-527.1993.
- Beattie, D. T., Shahin, R. and Mekalanos, J. J. (1991) 'A vir-repressed gene of *Bordetella pertussis* is required for virulence', *Infection and Immunity*. American Society for Microbiology (ASM), 60(2), pp. 571–577. doi: 10.1128/iai.60.2.571-577.1992.
- Belhart, K. *et al.* (2019) '*Bordetella bronchiseptica* diguanylate cyclase BdcA regulates motility and is important for the establishment of respiratory infection in mice', *Journal of Bacteriology*. doi: 10.1128/JB.00011-19.
- Bibova, I. *et al.* (2013) 'The RNA chaperone Hfq is required for virulence of *Bordetella pertussis*', *Infect Immun*, 81(11), pp. 4081–4090. doi: 10.1128/IAI.00345-13.
- Bibova, I. *et al.* (2015) 'Transcriptional profiling of *Bordetella pertussis* reveals requirement of RNA chaperone Hfq for type III secretion system functionality', *RNA Biology*. Taylor and Francis Inc., 12(2), pp. 175–185. doi: 10.1080/15476286.2015.1017237.
- Bjørnstad, O. N. and Harvill, E. T. (2005) 'Evolution and emergence of *Bordetella* in humans.', *Trends in microbiology*, 13(8), pp. 355–9. doi: 10.1016/j.tim.2005.06.007.
- Le Blay, K. *et al.* (1997) 'Antigenic polymorphism of the lipopolysaccharides from human and animal isolates of *Bordetella bronchiseptica*', *Microbiology*. Microbiology Society, 143(4), pp. 1433–1441. doi: 10.1099/00221287-143-4-1433.
- Boyle, J. S. and Lew, A. M. (1995) 'An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification', *Trends in Genetics*. Elsevier Ltd, p. 8. doi: 10.1016/S0168-9525(00)88977-5.
- Braeken, K. *et al.* (2006) 'New horizons for (p)ppGpp in bacterial and plant physiology', *Trends in Microbiology*. Trends Microbiol, pp. 45–54. doi: 10.1016/j.tim.2005.11.006.
- Brickman, T. J. *et al.* (2011) 'Transcriptional profiling of the iron starvation response in *Bordetella pertussis* Provides new insights into siderophore utilization and virulence gene expression', *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology, 193(18), pp. 4798–4812. doi: 10.1128/JB.05136-11.
- Brockmeier, S. L. *et al.* (2002) 'Role of the dermonecrotic toxin of *Bordetella bronchiseptica* in the pathogenesis of respiratory disease in swine', *Infection and Immunity*. American Society for Microbiology (ASM), 70(2), pp. 481–490. doi: 10.1128/IAI.70.2.481-490.2002.
- Byrd, M. S. *et al.* (2013) 'An improved recombination-based in vivo expression technology-like reporter system reveals differential *cyaA* gene activation in *Bordetella* species.', *Infection and immunity*. American Society for Microbiology (ASM), 81(4), pp. 1295–305. doi: 10.1128/IAI.01445-12.
- Callow, J. A. and Callow, M. E. (2006) 'Biofilms', in *Antifouling Compounds*. Springer Berlin

Heidelberg, pp. 141–169. doi: 10.1007/3-540-30016-3_6.

de Castro, E. *et al.* (2006) 'ScanProsite: Detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins', *Nucleic Acids Research*, 34(WEB. SERV. ISS.), pp. 362–365. doi: 10.1093/nar/gkl124.

Cattelan, N. *et al.* (2017) 'Hyperbiofilm Formation by Bordetella pertussis Strains Correlates with Enhanced Virulence Traits.', *Infection and Immunity*. American Society for Microbiology (ASM), 85(12). doi: 10.1128/IAI.00373-17.

Cattelan, N. *et al.* (2018) 'Bordetella biofilms: A lifestyle leading to persistent infections', *Pathogens and Disease*. Oxford University Press, 74(1). doi: 10.1093/femspd/ftv108.

Chaban, B., Hughes, H. V. and Beeby, M. (2015) 'The flagellum in bacterial pathogens: For motility and a whole lot more', *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Academic Press, pp. 91–103. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.10.032.

Chen, M. W. *et al.* (2012) 'Structural insights into the regulatory mechanism of the response regulator RocR from Pseudomonas aeruginosa in cyclic Di-GMP signaling', *Journal of Bacteriology*. J Bacteriol, 194(18), pp. 4837–4846. doi: 10.1128/JB.00560-12.

Chen, Q. *et al.* (2017) 'Activation of Bvg-repressed genes in Bordetella pertussis by RisA requires cross talk from noncooperonic histidine kinase Risk', *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology, 199(22). doi: 10.1128/JB.00475-17.

Chen, Q. and Stibitz, S. (2019) 'The BvgAS virulence regulon of Bordetella pertussis', *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd, pp. 74–81. doi: 10.1016/j.mib.2019.01.002.

Chenal-Franco, V. *et al.* (2009) 'Genomic analysis of the adenylate cyclase-hemolysin C-terminal region of Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica', *Research in Microbiology*. Res Microbiol, 160(5), pp. 330–336. doi: 10.1016/j.resmic.2009.03.006.

Christen, M. *et al.* (2005) 'Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP', *Journal of Biological Chemistry*, 280(35), pp. 30829–30837. doi: 10.1074/jbc.M504429200.

Christen, M. *et al.* (2007) 'DgrA is a member of a new family of cyclic diguanosine monophosphate receptors and controls flagellar motor function in Caulobacter crescentus', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 104(10), pp. 4112–4117. doi: 10.1073/pnas.0607738104.

Conover, M. S. *et al.* (2010) 'The Bps polysaccharide of Bordetella pertussis promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin.', *Molecular Microbiology*. NIH Public Access, 77(6), pp. 1439–55. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07297.x.

Conover, M. S. *et al.* (2012) 'BpsR modulates Bordetella biofilm formation by negatively regulating the expression of the Bps polysaccharide', *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology (ASM), 194(2), pp. 233–242. doi: 10.1128/JB.06020-11.

Conover, M. S., Mishra, M. and Deora, R. (2011) 'Extracellular DNA is essential for maintaining Bordetella biofilm integrity on abiotic surfaces and in the upper respiratory tract of mice', *PLoS ONE*. PLoS One, 6(2). doi: 10.1371/journal.pone.0016861.

Correa, A. *et al.* (2014) 'Generation of a vector suite for protein solubility screening', *Frontiers*

- in Microbiology*. Frontiers Research Foundation, 5(FEB). doi: 10.3389/fmicb.2014.00067.
- Costerton, J. W., Geesey, G. G. and Cheng, K. J. (1978) 'How bacteria stick.', *Scientific American*, 238(1), pp. 86–95. doi: 10.1038/scientificamerican0178-86.
- Cotter, P. A. *et al.* (1998) 'Filamentous hemagglutinin of *Bordetella bronchiseptica* is required for efficient establishment of tracheal colonization', *Infection and Immunity*. American Society for Microbiology, 66(12), pp. 5921–5929. doi: 10.1128/iai.66.12.5921-5929.1998.
- Cotter, Peggy A. and Jones, A. M. (2003) 'Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*', *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd, pp. 367–373. doi: 10.1016/S0966-842X(03)00156-2.
- Cotter, P A and Jones, A. M. (2003) 'Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*', *Trends Microbiol*, 11(8), pp. 367–373.
- Cotter, P. A. and Miller, J. F. (1994) 'BvgAS-mediated signal transduction: Analysis of phase-locked regulatory mutants of *Bordetella bronchiseptica* in a rabbit model', *Infection and Immunity*. Infect Immun, 62(8), pp. 3381–3390. doi: 10.1128/iai.62.8.3381-3390.1994.
- Coutte, L. *et al.* (2016) 'The multifaceted RisA regulon of *Bordetella pertussis*.', *Scientific reports*. Nature Publishing Group, 6, p. 32774. doi: 10.1038/srep32774.
- Coutte, L. *et al.* (2020) ' Combined RNAseq and ChIPseq Analyses of the BvgA Virulence Regulator of *Bordetella pertussis* ', *mSystems*. American Society for Microbiology, 5(3). doi: 10.1128/msystems.00208-20.
- Coutts, A. J. *et al.* (1996) 'Studies on natural transmission of *Bordetella bronchiseptica* in cats', *Veterinary Microbiology*. Elsevier B.V., 48(1–2), pp. 19–27. doi: 10.1016/0378-1135(95)00128-X.
- Cróinín, T. O., Grippe, V. K. and Merkel, T. J. (2005) 'Activation of the vrg6 promoter of *Bordetella pertussis* by RisA.', *Journal of bacteriology*, 187(5), pp. 1648–58. doi: 10.1128/JB.187.5.1648-1658.2005.
- Cummings, C. A. *et al.* (2006) 'Species- and strain-specific control of a complex, flexible regulon by *Bordetella BvgAS*', *Journal of Bacteriology*, 188(5), pp. 1775–1785. doi: 10.1128/JB.188.5.1775-1785.2006.
- Curtis, M. M. and Sperandio, V. (2011) 'A complex relationship: The interaction among symbiotic microbes, invading pathogens, and their mammalian host', *Mucosal Immunology*. NIH Public Access, pp. 133–138. doi: 10.1038/mi.2010.89.
- Dahlstrom, K. M. *et al.* (2015) 'Contribution of Physical Interactions to Signaling Specificity between a Diguanylate Cyclase and Its Effector', *mBio*, 6(6), pp. e01978-15. doi: 10.1128/mBio.01978-15.
- Decker, K. B. *et al.* (2012) 'The *Bordetella pertussis* model of exquisite gene control by the global transcription factor BvgA', *Microbiology (United Kingdom)*. Microbiology Society, pp. 1665–1676. doi: 10.1099/mic.0.058941-0.
- Dewan, K. K. *et al.* (2017) 'An Extracellular Polysaccharide Locus Required for Transmission of *Bordetella bronchiseptica*', *Journal of Infectious Diseases*. Oxford University Press, 216(7), pp. 899–906. doi: 10.1093/infdis/jix251.

- Dienstbier, A. *et al.* (2019) 'Comparative integrated omics analysis of the Hfq regulon in *Bordetella pertussis*', *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG, 20(12). doi: 10.3390/ijms20123073.
- Dunne, A. *et al.* (2010) 'Inflammasome Activation by Adenylate Cyclase Toxin Directs Th17 Responses and Protection against *Bordetella pertussis*', *The Journal of Immunology*, 185(3), pp. 1711–1719. doi: 10.4049/jimmunol.1000105.
- F. Corpet (1988) 'Multiple sequence alignment with hierarchical clustering.', *Nucleic Acids Res.*, 16(22), pp. 10881–10890. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC338945/> (Accessed: 27 March 2020).
- Feliciano, J. R. *et al.* (2016) 'Hfq: A multifaceted RNA chaperone involved in virulence', *Future Microbiology*. Future Medicine Ltd., pp. 137–151. doi: 10.2217/fmb.15.128.
- Fennelly, N. K. *et al.* (2008) 'Bordetella pertussis expresses a functional type III secretion system that subverts protective innate and adaptive immune responses', *Infection and Immunity*, 76(3). doi: 10.1128/IAI.00836-07.
- Fernandez, J. (2004) *Patogénesis y persistencia de Bordetella bronchiseptica en el hospedador: requerimientos de la variación fenotípica y de los factores de avirulencia*. Universidad Nacional de La Plata.
- Fernández, J. *et al.* (2005) 'Constitutive expression of bvgR-repressed factors is not detrimental to the *Bordetella bronchiseptica*-host interaction', *Research in Microbiology*, 156(8). doi: 10.1016/j.resmic.2005.04.003.
- Fiser, R. *et al.* (2012) 'Calcium influx rescues adenylate cyclase-hemolysin from rapid cell membrane removal and enables phagocyte permeabilization by toxin pores', *PLoS Pathogens*. Public Library of Science, 8(4), p. 1002580. doi: 10.1371/journal.ppat.1002580.
- Gaillard, M E *et al.* (2011) 'Laboratory adaptation of *Bordetella pertussis* is associated with the loss of type three secretion system functionality.', *Infection and immunity*, 79(9), pp. 3677–82. doi: 10.1128/IAI.00136-11.
- Gaillard, M. E. *et al.* (2011) 'Laboratory adaptation of *Bordetella pertussis* is associated with the loss of type three secretion system functionality', *Infection and Immunity*. Infect Immun, 79(9), pp. 3677–3682. doi: 10.1128/IAI.00136-11.
- Gestal, M. C. *et al.* (2018) 'Blood or serum exposure induce global transcriptional changes, altered antigenic profile, and increased cytotoxicity by classical bordetellae', *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A., 9(SEP). doi: 10.3389/fmicb.2018.01969.
- Gestal, M. C., Whitesides, L. T. and Harvill, E. T. (2019) 'Integrated Signaling Pathways Mediate *Bordetella* Immunomodulation, Persistence, and Transmission', *Trends in Microbiology*, 27(2), pp. 118–130. doi: 10.1016/j.tim.2018.09.010.
- Giacalone, D. *et al.* (2018) 'Ligand-mediated biofilm formation via enhanced physical interaction between a diguanylate cyclase and its receptor', *mBio*. American Society for Microbiology, 9(4). doi: 10.1128/mBio.01254-18.
- Giardina, P. C. *et al.* (1995) 'bvg Repression of alcaligin synthesis in *Bordetella bronchiseptica* is associated with phylogenetic lineage', *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology, 177(21), pp. 6058–6063. doi: 10.1128/jb.177.21.6058-6063.1995.

Gonyar, L. A. *et al.* (2017a) 'Albumin, in the presence of calcium, elicits a massive increase in extracellular Bordetella adenylate cyclase toxin', *Infection and Immunity*. American Society for Microbiology, 85(6). doi: 10.1128/IAI.00198-17.

Gonyar, L. A. *et al.* (2017b) 'Albumin, in the Presence of Calcium, Elicits a Massive Increase in Extracellular Bordetella Adenylate Cyclase Toxin', *Infection and Immunity*. Edited by S. R. Blanke, 85(6). doi: 10.1128/IAI.00198-17.

Goodnow, R. A. (1980) 'Biology of Bordetella bronchiseptica.', *Microbiological reviews*, 44(4), pp. 722–38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7010115> (Accessed: 17 June 2019).

Gorringe, A. R., Woods, G. and Robinson, A. (1990) 'Growth and siderophore production by Bordetella pertussis under iron-restricted conditions', *FEMS Microbiology Letters*. FEMS Microbiol Lett, 66(1–3), pp. 101–105. doi: 10.1016/0378-1097(90)90265-R.

Goto, M. *et al.* (2020) 'Transcriptional downregulation of a Type III secretion system under reducing conditions in bordetella pertussis', *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology, 202(21). doi: 10.1128/JB.00400-20.

Gray, M. *et al.* (1998) 'Distinct mechanisms for K⁺ efflux, intoxication, and hemolysis by Bordetella pertussis AC toxin', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 273(29), pp. 18260–18267. doi: 10.1074/jbc.273.29.18260.

Gray, M. C. *et al.* (2004) 'Newly secreted adenylate cyclase toxin is responsible for intoxication of target cells by Bordetella pertussis', *Molecular Microbiology*. Mol Microbiol, 53(6), pp. 1709–1719. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04227.x.

Green, M. R. and Sambrook, J. (2016) 'Preparation of plasmid DNA by alkaline lysis with sodium dodecyl sulfate: Minipreps', *Cold Spring Harbor Protocols*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2016(10), pp. 911–916. doi: 10.1101/pdb.prot093344.

Gueirard, P., Minoprio, P. and Guiso, N. (1996) 'Intranasal inoculation of Bordetella bronchiseptica in mice induces long-lasting antibody and T-Cell mediated immune responses', *Scandinavian Journal of Immunology*. Blackwell Publishing Ltd, 43(2), pp. 181–192. doi: 10.1046/j.1365-3083.1996.d01-30.x.

Guilhen, C. *et al.* (2019) 'Colonization and immune modulation properties of Klebsiella pneumoniae biofilm-dispersed cells', *npj Biofilms and Microbiomes*. Nature Publishing Group, 5(1), p. 25. doi: 10.1038/s41522-019-0098-1.

Guiso, N. (2017) 'Bordetella adenylate cyclase-hemolysin toxins', *Toxins*. MDPI AG. doi: 10.3390/toxins9090277.

Haiko, J. and Westerlund-Wikström, B. (2013) 'The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence', *Biology*. MDPI AG, pp. 1242–1267. doi: 10.3390/biology2041242.

Hanawa, T. *et al.* (2013) 'Role of Bordetella pertussis RseA in the cell envelope stress response and adenylate cyclase toxin release', *Pathogens and Disease*. Blackwell Publishing Ltd, 69(1), pp. 7–20. doi: 10.1111/2049-632X.12061.

Hasan, S. *et al.* (2018) 'Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin disrupts functional integrity of bronchial epithelial layers', *Infection and Immunity*. American Society for Microbiology, 86(3). doi: 10.1128/IAI.00445-17.

Hayashi, F. *et al.* (2001) 'The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5', *Nature*. *Nature*, 410(6832), pp. 1099–1103. doi: 10.1038/35074106.

Hebditch, M. *et al.* (2017) 'Protein-Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence.', *Bioinformatics (Oxford, England)*, 33(19), pp. 3098–3100. doi: 10.1093/bioinformatics/btx345.

Henderson, M. W. *et al.* (2012) 'Contribution of Bordetella filamentous hemagglutinin and adenylate cyclase toxin to suppression and evasion of interleukin-17-mediated inflammation', *Infection and Immunity*. American Society for Microbiology, 80(6), pp. 2061–2075. doi: 10.1128/IAI.00148-12.

Hengge, R. (2009) 'Principles of c-di-GMP signalling in bacteria', *Nature Reviews Microbiology*. *Nat Rev Microbiol*, pp. 263–273. doi: 10.1038/nrmicro2109.

Hester, S. E. *et al.* (2012) 'Identification of a CO₂ Responsive Regulon in Bordetella', *PLoS ONE*. *PLoS One*, 7(10). doi: 10.1371/journal.pone.0047635.

Hickman, J. W. and Harwood, C. S. (2008) 'Identification of FleQ from Pseudomonas aeruginosa as a c-di-GMP-responsive transcription factor', *Molecular Microbiology Microbiol*, 69(2), pp. 206–221. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06281.x. Identification.

Higgs, R. *et al.* (2012) 'Immunity to the respiratory pathogen Bordetella pertussis', *Mucosal Immunology*. Nature Publishing Group, pp. 485–500. doi: 10.1038/mi.2012.54.

Hoffman, C. *et al.* (2017) 'Bordetella adenylate cyclase toxin interacts with filamentous haemagglutinin to inhibit biofilm formation in vitro', *Molecular Microbiology*. Blackwell Publishing Ltd, 103(2), pp. 214–228. doi: 10.1111/mmi.13551.

Hoffman, C. L. *et al.* (2019) 'Bordetella pertussis can be motile and express flagellum-like structures', *mBio*. American Society for Microbiology, 10(3). doi: 10.1128/mBio.00787-19.

Horiguchi, Y., Nakai, T. and Kume, K. (1991) 'Effects of Bordetella bronchiseptica dermonecrotic toxin on the structure and function of osteoblastic clone MC3T3-E1 cells', *Infection and Immunity*. *Infect Immun*, 59(3), pp. 1112–1116. doi: 10.1128/iai.59.3.1112-1116.1991.

Horiguchi, Y., Sugimoto, N. and Matsuda, M. (1993) 'Stimulation of DNA synthesis in osteoblast-like MC3T3-E1 cells by Bordetella bronchiseptica dermonecrotic toxin', *Infection and Immunity*. *Infect Immun*, 61(9), pp. 3611–3615. doi: 10.1128/iai.61.9.3611-3615.1993.

Hou, Y. J. *et al.* (2020) 'Structural insights into the mechanism of c-di-GMP-bound YcgR regulating flagellar motility in Escherichia coli', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., 295(3), pp. 808–821. doi: 10.1074/jbc.RA119.009739.

Inatsuka, C. S., Julio, S. M. and Cotter, P. A. (2005) 'Bordetella filamentous hemagglutinin plays a critical role in immunomodulation, suggesting a mechanism for host specificity', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 102(51), pp. 18578–18583. doi: 10.1073/pnas.0507910102.

Irie, Yasuhiko, Mattoo, S. and Yuk, Ming H (2004) 'The Bvg virulence control system regulates biofilm formation in Bordetella bronchiseptica.', *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology (ASM), 186(17), pp. 5692–8. doi: 10.1128/JB.186.17.5692-5698.2004.

Irie, Yasuhiko, Mattoo, S. and Yuk, Ming H. (2004) 'The Bvg virulence control system regulates

- biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*', *Journal of Bacteriology*. *J Bacteriol*, 186(17), pp. 5692–5698. doi: 10.1128/JB.186.17.5692-5698.2004.
- Irie, Y., Mattoo, S. and Yuk, M. H. (2004) 'The Bvg Virulence Control System Regulates Biofilm Formation in *Bordetella bronchiseptica*', *Journal of Bacteriology*, 186(17), pp. 5692–5698. doi: 10.1128/JB.186.17.5692-5698.2004.
- Jenal, U. and Malone, J. (2006) 'Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria', *Annual Review of Genetics*. *Annu Rev Genet*, pp. 385–407. doi: 10.1146/annurev.genet.40.110405.090423.
- Jenal, U., Reinders, A. and Lori, C. (2017) 'Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire', *Nature Reviews Microbiology*, 15(5), pp. 271–284. doi: 10.1038/nrmicro.2016.190.
- Johnson, S. *et al.* (2019) 'The structure of an injectisome export gate demonstrates conservation of architecture in the core export gate between flagellar and virulence type III secretion systems', *mBio*. *American Society for Microbiology*, 10(3). doi: 10.1128/mBio.00818-19.
- Julio, S. M. *et al.* (2009) 'Natural-host animal models indicate functional interchangeability between the filamentous haemagglutinins of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica* and reveal a role for the mature C-terminal domain, but not the RGD motif, during infection', *Molecular Microbiology*. *Mol Microbiol*, 71(6), pp. 1574–1590. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06623.x.
- Kamanova, J. (2020) 'Bordetella Type III Secretion Injectosome and Effector Proteins', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. *Frontiers Media S.A.*, p. 466. doi: 10.3389/fcimb.2020.00466.
- Kang, H. Y. *et al.* (1996) 'Identification and characterization of iron-regulated *Bordetella pertussis* alcaligin siderophore biosynthesis genes', *Journal of Bacteriology*. *American Society for Microbiology*, 178(16), pp. 4877–4884. doi: 10.1128/jb.178.16.4877-4884.1996.
- Kelley, L. A. *et al.* (2015) 'The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis', *Nature Protocols*, 10(6), pp. 845–858. doi: 10.1038/nprot.2015.053.
- Kim, J. K., Mulrooney, S. B. and Hausinger, R. P. (2006) 'The UreEF fusion protein provides a soluble and functional form of the UreF urease accessory protein', *Journal of Bacteriology*. *American Society for Microbiology (ASM)*, 188(24), pp. 8413–8420. doi: 10.1128/JB.01265-06.
- Kimura, A. *et al.* (1990) 'Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin: Evaluation as a protective antigen and colonization factor in a mouse respiratory infection model', *Infection and Immunity*. *American Society for Microbiology (ASM)*, 58(1), pp. 7–16. doi: 10.1128/iai.58.1.7-16.1990.
- Knappt, S. and Mekalanos, J. J. (1988) *Two trans-Acting Regulatory Genes (vir and mod) Control Antigenic Modulation in Bordetella pertussis*, *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*.
- Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M. and Hultgren, S. J. (2013) 'Bacterial biofilms: Development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 3(4). doi: 10.1101/cshperspect.a010306.
- Kovach, M. E. *et al.* (1994) 'pBBR1MCS: A broad-host-range cloning vector', *BioTechniques*, 16(5), pp. 800–802. Available at: <https://europepmc.org/article/med/8068328> (Accessed: 5

March 2021).

Kuchma, S. L. *et al.* (2007) 'BifA, a cyclic-di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14', in *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology (ASM), pp. 8165–8178. doi: 10.1128/JB.00586-07.

Kurushima, J., Kuwae, A. and Abe, A. (2012a) 'Btc22 chaperone is required for secretion and stability of the type III secreted protein Bsp22 in *Bordetella bronchiseptica*', *FEMS Microbiology Letters*. FEMS Microbiol Lett, 331(2), pp. 144–151. doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02561.x.

Kurushima, J., Kuwae, A. and Abe, A. (2012b) 'Iron starvation regulates the type III secretion system in *Bordetella bronchiseptica*', *Microbiology and Immunology*. Microbiol Immunol, 56(6), pp. 356–362. doi: 10.1111/j.1348-0421.2012.00442.x.

Laoide, B. M. and Ullmann, A. (1990) 'Virulence dependent and independent regulation of the *Bordetella pertussis* cya operon', *EMBO Journal*. EMBO J, 9(4), pp. 999–1005. doi: 10.1002/j.1460-2075.1990.tb08202.x.

Lee, S. J. *et al.* (1999) 'Epitope mapping of monoclonal antibodies against *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin', *Infection and Immunity*. American Society for Microbiology, 67(5), pp. 2090–2095. doi: 10.1128/iai.67.5.2090-2095.1999.

Lee, V. T. *et al.* (2007) 'A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production', *Molecular Microbiology*. Mol Microbiol, 65(6), pp. 1474–1484. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05879.x.

Leininger, E. *et al.* (1991) 'Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Proc Natl Acad Sci U S A, 88(2), pp. 345–349. doi: 10.1073/pnas.88.2.345.

Lesne, E. *et al.* (2017) 'Conformational changes of an interdomain linker mediate mechanical signal transmission in sensor kinase BvgS', *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology, 199(18). doi: 10.1128/JB.00114-17.

Lesne, E. *et al.* (2018) 'Distinct virulence ranges for infection of mice by *Bordetella pertussis* revealed by engineering of the sensor-kinase BvgS', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 13(10). doi: 10.1371/journal.pone.0204861.

Li, B. *et al.* (2017) '*Salmonella* STM1697 coordinates flagella biogenesis and virulence by restricting flagellar master protein FlhD4C2 from recruiting RNA polymerase', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 45(17), pp. 9976–9989. doi: 10.1093/nar/gkx656.

Linz, B. *et al.* (2016) 'Acquisition and loss of virulence-associated factors during genome evolution and speciation in three clades of *Bordetella* species', *BMC Genomics*. BioMed Central Ltd., 17(1), p. 767. doi: 10.1186/s12864-016-3112-5.

Linz, B. *et al.* (2019) 'Genotypic and phenotypic adaptation of pathogens: Lesson from the genus *Bordetella*', *Current Opinion in Infectious Diseases*. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 223–230. doi: 10.1097/QCO.0000000000000549.

López-Boado, Y. S., Cobb, L. M. and Deora, R. (2005) '*Bordetella bronchiseptica* flagellin is a proinflammatory determinant for airway epithelial cells', *Infection and Immunity*. Infect

Immun, 73(11), pp. 7525–7534. doi: 10.1128/IAI.73.11.7525-7534.2005.

Mann, Paul B *et al.* (2004) 'Toll-like receptor 4-dependent early elicited tumor necrosis factor alpha expression is critical for innate host defense against *Bordetella bronchiseptica*.', *Infection and immunity*. American Society for Microbiology (ASM), 72(11), pp. 6650–8. doi: 10.1128/IAI.72.11.6650-6658.2004.

Mann, Paul B. *et al.* (2004) 'Toll-like receptor 4-dependent early elicited tumor necrosis factor alpha expression is critical for innate host defense against *Bordetella bronchiseptica*', *Infection and Immunity*, 72(11), pp. 6650–6658. doi: 10.1128/IAI.72.11.6650-6658.2004.

Martinez de Tejada, G. *et al.* (1998a) 'Neither the Bvg- phase nor the vrg6 locus of *Bordetella pertussis* is required for respiratory infection in mice.', *Infection and immunity*, 66(6), pp. 2762–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9596745> (Accessed: 13 April 2020).

Martinez de Tejada, G. *et al.* (1998b) 'Neither the Bvg- phase nor the vrg6 locus of *Bordetella pertussis* is required for respiratory infection in mice', *Infect Immun*, 66(6), pp. 2762–2768.

Masin, J. *et al.* (2015) 'Bordetella adenylate cyclase toxin: A unique combination of a pore-forming moiety with a cell-invading adenylate cyclase enzyme', *Pathogens and Disease*. Oxford University Press. doi: 10.1093/femspd/ftv075.

Mattoo, S. *et al.* (2001) 'Mechanisms of *Bordetella* pathogenesis.', *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 6, pp. E168-86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11689354> (Accessed: 21 September 2017).

Mattoo, S. *et al.* (2004) 'Regulation of type III secretion in *Bordetella*', *Molecular Microbiology*. Mol Microbiol, 52(4), pp. 1201–1214. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04053.x.

Mattoo, S. and Cherry, J. D. (2005) 'Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella pertussis* and Other *Bordetella* Subspecies', *Clinical Microbiology Reviews*, 18(2), pp. 326–382. doi: 10.1128/CMR.18.2.326-382.2005.

Mattoo, S., Miller, J. F. and Cotter, P. A. (2000) 'Role of *Bordetella bronchiseptica* fimbriae in tracheal colonization and development of a humoral immune response', *Infection and Immunity*. Infect Immun, 68(4), pp. 2024–2033. doi: 10.1128/IAI.68.4.2024-2033.2000.

McKee, R. W., Harvest, C. K. and Tamayo, R. (2018) 'Cyclic Diguanylate Regulates Virulence Factor Genes via Multiple Riboswitches in *Clostridium difficile*', *mSphere*. American Society for Microbiology, 3(5). doi: 10.1128/msphere.00423-18.

McMillan, D. J. *et al.* (1996) 'Molecular analysis of the bvg-repressed urease of *Bordetella bronchiseptica*', *Microbial Pathogenesis*. Academic Press, 21(5), pp. 379–394. doi: 10.1006/mpat.1996.0069.

McMillan, D. J. *et al.* (1999) 'Expression of urease does not affect the ability of *Bordetella bronchiseptica* to colonise and persist in the murine respiratory tract', *FEMS Microbiology Letters*. Oxford University Press (OUP), 178(1), pp. 7–11. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13752.x.

McMillan, D. J., Mau, M. and Walker, M. J. (1998) 'Characterisation of the urease gene cluster in *Bordetella bronchiseptica*', *Gene*. Gene, 208(2), pp. 243–251. doi: 10.1016/S0378-1119(97)00651-3.

Medhekar, B. *et al.* (2009) 'Bordetella Bsp22 forms a filamentous type III secretion system tip complex and is immunoprotective in vitro and in vivo', *Molecular Microbiology*. Mol Microbiol, 71(2), pp. 492–504. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06543.x.

Melvin, J. A. *et al.* (2014) 'Bordetella pertussis pathogenesis: current and future challenges.', *Nature reviews. Microbiology*. NIH Public Access, 12(4), pp. 274–88. doi: 10.1038/nrmicro3235.

Merck Animal Health USA (no date). Available at: <https://www.merck-animal-health-usa.com/> (Accessed: 29 October 2020).

Merkel, T. J. *et al.* (1998) 'Contribution of regulation by the bvg locus to respiratory infection of mice by Bordetella pertussis', *Infection and Immunity*. American Society for Microbiology, 66(9), pp. 4367–4373. doi: 10.1128/.66.9.4367-4373.1998.

Merkel, T. J. *et al.* (2003) 'Analysis of bvgR expression in Bordetella pertussis.', *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology (ASM), 185(23), pp. 6902–12. doi: 10.1128/JB.185.23.6902-6912.2003.

Merkel, T. J., Barros, C. and Stibitz, S. (1998) 'Characterization of the bvgR locus of Bordetella pertussis.', *Journal of bacteriology*, 180(7), pp. 1682–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9537363> (Accessed: 21 September 2017).

Merkel, T. J. and Stibitz, S. (1995) 'Identification of a locus required for the regulation of bvg-repressed genes in Bordetella pertussis', *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology, 177(10), pp. 2727–2736. doi: 10.1128/jb.177.10.2727-2736.1995.

Michael, B. *et al.* (2007) 'Evaluation of organ weights for rodent and non-rodent toxicity studies: a review of regulatory guidelines and a survey of current practices.', *Toxicologic pathology*, pp. 742–750. doi: 10.1080/01926230701595292.

Ming Huam, Y. *et al.* (2000) 'Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF- κ B activation by the Bordetella type III secretion system', *Molecular Microbiology*. Mol Microbiol, 35(5), pp. 991–1004. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01785.x.

Mishra, M. *et al.* (2005) 'The BvgAS signal transduction system regulates biofilm development in Bordetella', *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology (ASM), 187(4), pp. 1474–1484. doi: 10.1128/JB.187.4.1474-1484.2005.

Monack, D. M. and Falkow, S. (1993) 'Cloning of Bordetella bronchiseptica urease genes and analysis of colonization by a urease-negative mutant strain in a guinea-pig model', *Molecular Microbiology*. Mol Microbiol, 10(3), pp. 545–553. doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb00926.x.

Mooi, F. R. (2010) 'Bordetella pertussis and vaccination: The persistence of a genetically monomorphic pathogen', *Infection, Genetics and Evolution*. Infect Genet Evol, pp. 36–49. doi: 10.1016/j.meegid.2009.10.007.

Moon, K. *et al.* (2017) 'The BvgAS regulon of Bordetella pertussis', *mBio*. American Society for Microbiology, 8(5). doi: 10.1128/mBio.01526-17.

Moore, C. H. *et al.* (1995) 'Identification of alcaligin as the siderophore produced by Bordetella pertussis and B. bronchiseptica', *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology, 177(4), pp. 1116–1118. doi: 10.1128/jb.177.4.1116-1118.1995.

Morales, E. S., Parcerisa, I. L. and Ceccarelli, E. A. (2019) 'A novel method for removing contaminant Hsp70 molecular chaperones from recombinant proteins', *Protein Science*.

Blackwell Publishing Ltd, 28(4), pp. 800–807. doi: 10.1002/pro.3574.

Morgan, J. L. W., McNamara, J. T. and Zimmer, J. (2014) 'Mechanism of activation of bacterial cellulose synthase by cyclic di-GMP', *Nature Structural and Molecular Biology*. Nature Publishing Group, 21(5), pp. 489–496. doi: 10.1038/nsmb.2803.

Mouali, Y. El *et al.* (2017) 'Stand-alone EAL domain proteins form a distinct subclass of EAL proteins involved in regulation of cell motility and biofilm formation in enterobacteria', *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology, 199(18). doi: 10.1128/JB.00179-17.

MSD Salud Animal (2015) *Cobactan 2,5%*. Available at: http://www.msd-salud-animal.com.ar/products/Cobactan_2_5/ProductDetails_112_141389.aspx (Accessed: 29 October 2020).

Nagamatsu, K. *et al.* (2009) 'Bordetella evades the host immune system by inducing IL-10 through a type III effector, BopN', *Journal of Experimental Medicine*. J Exp Med, 206(13), pp. 3073–3088. doi: 10.1084/jem.20090494.

Nash, Z. M. and Cotter, P. A. (2019) 'Regulated, sequential processing by multiple proteases is required for proper maturation and release of Bordetella filamentous hemagglutinin', *Molecular Microbiology*. Blackwell Publishing Ltd, 112(3), pp. 820–836. doi: 10.1111/mmi.14318.

Navarro, M. V. A. S. *et al.* (2009) 'Structural Analysis of the GGDEF-EAL Domain-Containing c-di-GMP Receptor FimX', *Structure*. Structure, 17(8), pp. 1104–1116. doi: 10.1016/j.str.2009.06.010.

Newell, P. D. *et al.* (2011) 'Systematic analysis of diguanylate cyclases that promote biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1', *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology (ASM), 193(18), pp. 4685–4698. doi: 10.1128/JB.05483-11.

Newell, P. D., Monds, R. D. and Toole, G. a O. (2009) 'LapD is a bis-(3',5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1', *PNAS*, 106(9).

Nicholson, T. L. (2007) 'Construction and validation of a first-generation Bordetella bronchiseptica long-oligonucleotide microarray by transcriptional profiling the Bvg regulon', *BMC Genomics*, 8, p. 220. doi: 10.1186/1471-2164-8-220.

Nicholson, T. L. *et al.* (2012) 'Phenotypic modulation of the virulent bvg phase is not required for pathogenesis and transmission of Bordetella bronchiseptica in swine', *Infection and Immunity*. American Society for Microbiology (ASM), 80(3), pp. 1025–1036. doi: 10.1128/IAI.06016-11.

Nicholson, T. L. *et al.* (2017) 'The Bordetella Bps Polysaccharide Is Required for Biofilm Formation and Enhances Survival in the Lower Respiratory Tract of Swine', *Infection and Immunity*. Edited by A. J. Bäumlner, 85(8). doi: 10.1128/IAI.00261-17.

Nicholson, T. L., Brockmeier, S. L. and Loving, C. L. (2009) 'Contribution of Bordetella bronchiseptica filamentous hemagglutinin and pertactin to respiratory disease in swine', *Infection and Immunity*. American Society for Microbiology (ASM), 77(5), pp. 2136–2146. doi: 10.1128/IAI.01379-08.

Nicholson, T. L., Conover, M. S. and Deora, R. (2012a) 'Transcriptome profiling reveals stage-specific production and requirement of flagella during biofilm development in Bordetella

bronchiseptica.', *PLoS one*, 7(11), p. e49166. doi: 10.1371/journal.pone.0049166.

Nicholson, T. L., Conover, M. S. and Deora, R. (2012b) 'Transcriptome profiling reveals stage-specific production and requirement of flagella during biofilm development in *Bordetella bronchiseptica*.' , *PLoS one*, 7(11), p. e49166. doi: 10.1371/journal.pone.0049166.

Nieves, D. J. and Heininger, U. (2016) '*Bordetella pertussis*', in *Emerging infections 10*. American Society of Microbiology, pp. 311–339. doi: 10.1128/microbiolspec.EI10-0008-2015.

Nishikawa, S. *et al.* (2016) 'The *bvg* -repressed gene *brtA* , encoding biofilm-associated surface adhesin, is expressed during host infection by *Bordetella bronchiseptica*' , *Microbiology and Immunology*. Blackwell Publishing Asia, 60(2), pp. 93–105. doi: 10.1111/1348-0421.12356.

Nixon Heiss, L. *et al.* (1994) *Epithelial autotoxicity of nitric oxide: Role in the respiratory cytopathology of pertussis (Bordetella pertussis/tracheal cytotoxin/muramyl peptide/bacterial toxins/interleukin 1)*.

O'Toole, G., Kaplan, H. B. and Kolter, R. (2000) 'Biofilm formation as microbial development', *Annual Review of Microbiology*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA , pp. 49–79. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.49.

Osterman, I. A. *et al.* (2015) 'Regulation of flagellar gene expression in Bacteria', *Biochemistry (Moscow)*. Maik Nauka Publishing / Springer SBM, pp. 1447–1456. doi: 10.1134/S000629791511005X.

Ozaki, S. *et al.* (2014) 'Activation and polar sequestration of PopA, a c-di-GMP effector protein involved in *Caulobacter crescentus* cell cycle control', *Molecular Microbiology*. Blackwell Publishing Ltd, 94(3), pp. 580–594. doi: 10.1111/mmi.12777.

Panina, E. M. *et al.* (2005) 'A genome-wide screen identifies a *Bordetella* type III secretion effector and candidate effectors in other species', *Molecular Microbiology*. Mol Microbiol, 58(1), pp. 267–279. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04823.x.

Parise, G. *et al.* (2007) 'Role of a putative polysaccharide locus in *Bordetella* biofilm development.' , *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology (ASM), 189(3), pp. 750–60. doi: 10.1128/JB.00953-06.

Parkhill, J. *et al.* (2003) 'Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*' , *Nature Genetics*, 35(1), pp. 32–40. doi: 10.1038/ng1227.

Paul, K. *et al.* (2010) 'The c-di-GMP Binding Protein YcgR Controls Flagellar Motor Direction and Speed to Affect Chemotaxis by a "Backstop Brake" Mechanism', *Molecular Cell*. NIH Public Access, 38(1), pp. 128–139. doi: 10.1016/j.molcel.2010.03.001.

Pesavento, C. *et al.* (2008a) 'Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*' , *Genes and Development*. Genes Dev, 22(17), pp. 2434–2446. doi: 10.1101/gad.475808.

Pesavento, C. *et al.* (2008b) 'Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*' , *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 22(17), pp. 2434–2446. doi: 10.1101/gad.475808.

Petráčková, D. *et al.* (2020) 'Transcriptional profiling of human macrophages during infection with *Bordetella pertussis*' , *RNA Biology*. Taylor and Francis Inc., 17(5), pp. 731–742. doi:

10.1080/15476286.2020.1727694.

Porter, J. F. and Wardlaw, A. C. (1993) 'Long-term survival of *Bordetella bronchiseptica* in lakewater and in buffered saline without added nutrients', *FEMS Microbiology Letters*. FEMS Microbiol Lett, 110(1), pp. 33–36. doi: 10.1111/j.1574-6968.1993.tb06291.x.

Pradel, E., Guiso, N. and Loch, C. (1998) 'Identification of AlcR, an AraC-type regulator of alcaligin siderophore synthesis in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis*', *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology, 180(4), pp. 871–880. doi: 10.1128/jb.180.4.871-880.1998.

Preston, A. *et al.* (1999) 'Genetic basis for lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in *Bordetellae*', *Infection and Immunity*. American Society for Microbiology, 67(8), pp. 3763–3767. doi: 10.1128/iai.67.8.3763-3767.1999.

Rabin, N. *et al.* (2015) 'Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents', *Future Medicinal Chemistry*. Future Science, pp. 493–512. doi: 10.4155/fmc.15.6.

Rao, F. *et al.* (2008) 'Catalytic mechanism of cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase: A study of the EAL domain-containing RocR from *Pseudomonas aeruginosa*', *Journal of Bacteriology*. J Bacteriol, 190(10), pp. 3622–3631. doi: 10.1128/JB.00165-08.

Rao, F. *et al.* (2009) 'The functional role of a conserved loop in EAL domain-based cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase', *Journal of Bacteriology*. J Bacteriol, 191(15), pp. 4722–4731. doi: 10.1128/JB.00327-09.

Register, K. B. *et al.* (2001) 'Reduced virulence of a *Bordetella bronchiseptica* siderophore mutant in neonatal swine', *Infection and Immunity*. American Society for Microbiology (ASM), 69(4), pp. 2137–2143. doi: 10.1128/IAI.69.4.2137-2143.2001.

Reinders, A. *et al.* (2016) 'Expression and genetic activation of cyclic di-GMP-specific phosphodiesterases in *Escherichia coli*', *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology, 198(3), pp. 448–462. doi: 10.1128/JB.00604-15.

Rogel, A. and Hanski, E. (1992) 'Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* into sheep erythrocytes. Translocation of the toxin across the membrane', *Journal of Biological Chemistry*. J Biol Chem, 267(31), pp. 22599–22605. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1429610/> (Accessed: 2 November 2020).

Rogers, A. *et al.* (2016) 'The LonA protease regulates biofilm formation, motility, virulence, and the type VI secretion system in *Vibrio cholerae*', *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology, 198(6), pp. 973–985. doi: 10.1128/JB.00741-15.

Rohrwild, M. *et al.* (1996) 'HsIV-HsIU: A novel ATP-dependent protease complex in *Escherichia coli* related to the eukaryotic proteasome', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 93(12), pp. 5808–5813. doi: 10.1073/pnas.93.12.5808.

Römling, U., Galperin, M. Y. and Gomelsky, M. (2013) 'Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger.', *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. American Society for Microbiology (ASM), 77(1), pp. 1–52. doi: 10.1128/MMBR.00043-12.

Römling, U., Liang, Z.-X. and Dow, J. M. (2017) 'Progress in Understanding the Molecular Basis Underlying Functional Diversification of Cyclic Dinucleotide Turnover Proteins.', *Journal of bacteriology*. Edited by W. Margolin, 199(5). doi: 10.1128/JB.00790-16.

Rosano, G. L. and Ceccarelli, E. A. (2009) 'Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted *Escherichia coli* strain', *Microbial Cell Factories*, 8, p. 41. doi: 10.1186/1475-2859-8-41.

Rosenthal, R. S. *et al.* (1987) 'Major fragment of soluble peptidoglycan released from growing *Bordetella pertussis* is tracheal cytotoxin', *Infection and Immunity*. *Infect Immun*, 55(9), pp. 2117–2120. doi: 10.1128/iai.55.9.2117-2120.1987.

Ross, P. J. *et al.* (2004) 'Adenylate Cyclase Toxin from *Bordetella pertussis* Synergizes with Lipopolysaccharide to Promote Innate Interleukin-10 Production and Enhances the Induction of Th2 and Regulatory T Cells', *Infection and Immunity*. American Society for Microbiology (ASM), 72(3), pp. 1568–1579. doi: 10.1128/IAI.72.3.1568-1579.2004.

Ryan, R. P. *et al.* (2009) 'HD-GYP domain proteins regulate biofilm formation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*', *Environmental Microbiology*. *Environ Microbiol*, 11(5), pp. 1126–1136. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01842.x.

Ryan, R. P. *et al.* (2010) 'Cell-cell signal-dependent dynamic interactions between HD-GYP and GGDEF domain proteins mediate virulence in *Xanthomonas campestris*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(13), pp. 5989–5994. doi: 10.1073/pnas.0912839107.

Ryjenkov, D. A. *et al.* (2006) 'The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: The PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria', *Journal of Biological Chemistry*. *J Biol Chem*, 281(41), pp. 30310–30314. doi: 10.1074/jbc.C600179200.

Scheller, E. V. and Cotter, P. A. (2015) 'Bordetella filamentous hemagglutinin and fimbriae: critical adhesins with unrealized vaccine potential', *Pathogens and disease*. Oxford University Press, p. ftv079. doi: 10.1093/femspd/ftv079.

Scheller, E. V. *et al.* (2015) 'Cooperative Roles for Fimbria and Filamentous Hemagglutinin in *Bordetella* Adherence and Immune Modulation'. doi: 10.1128/mBio.00500-15.

Schmidt, A. J., Ryjenkov, D. A. and Gomelsky, M. (2005) 'The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: Enzymatically active and inactive EAL domains', *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology (ASM), 187(14), pp. 4774–4781. doi: 10.1128/JB.187.14.4774-4781.2005.

Schröder, H. *et al.* (1993) 'DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage.', *The EMBO journal*. European Molecular Biology Organization, 12(11), pp. 4137–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7900997> (Accessed: 23 March 2020).

Schultz, J. *et al.* (1998) 'SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(11), pp. 5857–5864. doi: 10.1073/pnas.95.11.5857.

Schulz, B. S. *et al.* (2014) 'Detection of respiratory viruses and *Bordetella bronchiseptica* in dogs with acute respiratory tract infections', *Veterinary Journal*. Bailliere Tindall Ltd, 201(3), pp. 365–369. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.04.019.

Serra, D. O. *et al.* (2011) 'FHA-mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 6(12). doi: 10.1371/journal.pone.0028811.

Serra, D. O. *et al.* (2013) 'Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological

- differentiation in a bacterial biofilm', *mBio*, 4(2), pp. 1–12. doi: 10.1128/mBio.00103-13.
- Shanks, R. M. Q. *et al.* (2009) 'New yeast recombineering tools for bacteria', *Plasmid*, 62(2), pp. 88–97. doi: 10.1016/j.plasmid.2009.05.002.
- Short, F. L., Murdoch, S. L. and Ryan, R. P. (2014) 'Polybacterial human disease: The ills of social networking', *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd, pp. 508–516. doi: 10.1016/j.tim.2014.05.007.
- Siciliano, N. A., Skinner, J. A. and Yuk, M. H. (2006) 'Bordetella bronchiseptica Modulates Macrophage Phenotype Leading to the Inhibition of CD4 + T Cell Proliferation and the Initiation of a Th17 Immune Response', *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists, 177(10), pp. 7131–7138. doi: 10.4049/jimmunol.177.10.7131.
- Sigrist, C. J. A. *et al.* (2013) 'New and continuing developments at PROSITE', *Nucleic Acids Research*. Nucleic Acids Res, 41(D1). doi: 10.1093/nar/gks1067.
- Simm, R. *et al.* (2004) 'GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility', *Molecular Microbiology*, 53(4), pp. 1123–1134. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04206.x.
- Simon, R., Priefer, U. and Pühler, A. (1983) 'A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria', *Bio/Technology*, 1(9). doi: 10.1038/nbt1183-784.
- Sisti, F. *et al.* (2002) 'In vitro and in vivo characterization of a Bordetella bronchiseptica mutant strain with a deep rough lipopolysaccharide structure', *Infection and Immunity*. Infect Immun, 70(4), pp. 1791–1798. doi: 10.1128/IAI.70.4.1791-1798.2002.
- Sisti, F. *et al.* (2013) 'Cyclic-di-GMP signalling regulates motility and biofilm formation in Bordetella bronchiseptica', *Microbiology*, 159(Pt_5), pp. 869–879. doi: 10.1099/mic.0.064345-0.
- Skinner, J. A. *et al.* (2004) 'Bordetella Type III Secretion and Adenylate Cyclase Toxin Synergize to Drive Dendritic Cells into a Semimature State', *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists, 173(3), pp. 1934–1940. doi: 10.4049/jimmunol.173.3.1934.
- Sloan, G. P. *et al.* (2007) 'The Bordetella Bps polysaccharide is critical for biofilm development in the mouse respiratory tract', in *Journal of Bacteriology*. J Bacteriol, pp. 8270–8276. doi: 10.1128/JB.00785-07.
- Smith, S. C. *et al.* (2014) 'Cell cycle-dependent adaptor complex for ClpXP-mediated proteolysis directly integrates phosphorylation and second messenger signals', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 111(39), pp. 14229–14234. doi: 10.1073/pnas.1407862111.
- Sormanni, P., Aprile, F. A. and Vendruscolo, M. (2015) 'The CamSol method of rational design of protein mutants with enhanced solubility', *Journal of Molecular Biology*. Academic Press, 427(2), pp. 478–490. doi: 10.1016/j.jmb.2014.09.026.
- Soumana, I. H., Linz, B. and Harvill, E. T. (2017) 'Environmental origin of the genus Bordetella', *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A., 8(JAN). doi: 10.3389/fmicb.2017.00028.
- Srigley, J. A., Goldfarb, D. M. and Pernica, J. M. (2015) 'Bordetella species other than bordetella pertussis', *Clinical Microbiology Newsletter*. Elsevier Inc., 37(8), pp. 61–65. doi: 10.1016/j.clinmicnews.2015.03.004.

Stenson, T. H. and Pepler, M. S. (1995) *Identification of Two bvg-Repressed Surface Proteins of Bordetella pertussis*, *INFECTION AND IMMUNITY*.

Stephenson, E. H. *et al.* (1989) 'Efficacy of a commercial bacterin in protecting Strain 13 guineapigs against Bordetella bronchiseptica pneumonia', *Laboratory Animals*, 23(3), pp. 261–269. doi: 10.1258/002367789780810581.

Stockbauer, K. E. *et al.* (2001) 'Identification and characterization of BipA, a Bordetella Bvg-intermediate phase protein', *Molecular Microbiology*, 39(1), pp. 65–78. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02191.x.

Sugisaki, K. *et al.* (2013) 'Role of (p)ppGpp in biofilm formation and expression of filamentous structures in Bordetella pertussis', *Microbiology (United Kingdom)*. Microbiology Society, 159(PART7), pp. 1379–1389. doi: 10.1099/mic.0.066597-0.

Sukumar, N. *et al.* (2007) 'Differential Bvg phase-dependent regulation and combinatorial role in pathogenesis of two Bordetella paralogs, BipA and BcfA', *Journal of Bacteriology*, 189(10), pp. 3695–3704. doi: 10.1128/JB.00009-07.

Sukumar, N. *et al.* (2014) 'Comparative analyses of a cystic fibrosis isolate of Bordetella bronchiseptica reveal differences in important pathogenic phenotypes.', *Infection and immunity*. American Society for Microbiology (ASM), 82(4), pp. 1627–37. doi: 10.1128/IAI.01453-13.

Takaya, A. *et al.* (2012) 'YdiV: A dual function protein that targets FlhDC for ClpXP-dependent degradation by promoting release of DNA-bound FlhDC complex', *Molecular Microbiology*. Mol Microbiol, 83(6), pp. 1268–1284. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08007.x.

Tamayo, R., Tischler, A. D. and Camilli, A. (2005) 'The EAL domain protein VieA is a cyclic diguanylate phosphodiesterase', *Journal of Biological Chemistry*. NIH Public Access, 280(39), pp. 33324–33330. doi: 10.1074/jbc.M506500200.

Taylor-Mulneix, D. L. *et al.* (2017) 'Bordetella bronchiseptica exploits the complex life cycle of Dictyostelium discoideum as an amplifying transmission vector', *PLOS Biology*. Edited by M. Waldor. Public Library of Science, 15(4), p. e2000420. doi: 10.1371/journal.pbio.2000420.

Tazato, N. *et al.* (2015) 'Novel environmental species isolated from the plaster wall surface of mural paintings in the Takamatsuzuka tumulus: Bordetella muralis sp. nov., Bordetella tumulicola sp. nov. and Bordetella tumbae sp. nov.', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Microbiology Society, 65(12), pp. 4830–4838. doi: 10.1099/ijsem.0.000655.

Tchigvintsev, A. *et al.* (2010) 'Structural insight into the mechanism of c-di-GMP hydrolysis by EAL domain phosphodiesterases', *Journal of Molecular Biology*. Academic Press, 402(3), pp. 524–538. doi: 10.1016/j.jmb.2010.07.050.

De Tejada, G. M., Miller, J. F. and Cotter, P. A. (1996) 'Comparative analysis of the virulence control systems of Bordetella pertussis and Bordetella bronchiseptica', *Molecular Microbiology*. Blackwell Publishing Ltd, 22(5), pp. 895–908. doi: 10.1046/j.1365-2958.1996.01538.x.

Tolker-Nielsen, T. (2015) 'Biofilm Development', *Microbiology Spectrum*. American Society for Microbiology, 3(2). doi: 10.1128/microbiolspec.mb-0001-2014.

Villarino Romero, R. *et al.* (2013) 'The bordetella pertussis type III secretion system tip complex

protein Bsp22 is not a protective antigen and fails to elicit serum antibody responses during infection of humans and mice', *Infection and Immunity*. American Society for Microbiology (ASM), 81(8), pp. 2761–2767. doi: 10.1128/IAI.00353-13.

Voegelé, A. *et al.* (2018) 'Translocation and calmodulin-activation of the adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis*', *Pathogens and Disease*. Oxford University Press. doi: 10.1093/femspd/fty085.

Vojtova, J., Kamanova, J. and Sebo, P. (2006) 'Bordetella adenylate cyclase toxin: A swift saboteur of host defense', *Current Opinion in Microbiology*. Curr Opin Microbiol, pp. 69–75. doi: 10.1016/j.mib.2005.12.011.

Wada, T. *et al.* (2011) 'EAL domain protein YdiV acts as an anti-FlhD4C2 factor responsible for nutritional control of the flagellar regulon in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium.', *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology (ASM), 193(7), pp. 1600–11. doi: 10.1128/JB.01494-10.

Wada, T., Hatamoto, Y. and Kutsukake, K. (2012) 'Functional and expressional analyses of the anti-FlhD4C2 factor gene ydiV in *Escherichia coli*', *Microbiology (United Kingdom)*, 158(6), pp. 1533–1542. doi: 10.1099/mic.0.056036-0.

Wahlström, E. *et al.* (2013) 'Use of Lung Weight as Biomarker for Assessment of Lung Toxicity in Rat Inhalation Studies', *Toxicologic Pathology*. SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA, 41(6), pp. 902–912. doi: 10.1177/0192623312470763.

Wan, X. *et al.* (2009) 'Globins Synthesize the Second Messenger Bis-(3'-5')-Cyclic Diguanosine Monophosphate in Bacteria', *Journal of Molecular Biology*. Academic Press, 388(2), pp. 262–270. doi: 10.1016/j.jmb.2009.03.015.

Warfel, J. M., Zimmerman, L. I. and Merkel, T. J. (2014) 'Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 111(2), pp. 787–92. doi: 10.1073/pnas.1314688110.

Weinhouse, H. *et al.* (1997) 'C-di-GMP-binding protein, a new factor regulating cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*', *FEBS Letters*. FEBS Lett, 416(2), pp. 207–211. doi: 10.1016/S0014-5793(97)01202-7.

Wierenga, R. K. (2001) 'The TIM-barrel fold: A versatile framework for efficient enzymes', *FEBS Letters*, pp. 193–198. doi: 10.1016/S0014-5793(01)02236-0.

Williams, C. L. and Cotter, P. A. (2007) 'Autoregulation is essential for precise temporal and steady-state regulation by the *Bordetella* BvgAS phosphorelay', *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology (ASM), 189(5), pp. 1974–1982. doi: 10.1128/JB.01684-06.

Woolfrey, B. F. and Moody, J. A. (1991) 'Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*', *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology (ASM), pp. 243–255. doi: 10.1128/CMR.4.3.243.

Wu, S. *et al.* (2011) 'WebMGA: A customizable web server for fast metagenomic sequence analysis', *BMC Genomics*. BioMed Central, 12(1), p. 444. doi: 10.1186/1471-2164-12-444.

Yang, F. *et al.* (2012) 'A novel two-component system PdeK/PdeR regulates c-di-GMP turnover and virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*', *Molecular Plant-Microbe Interactions*. Mol Plant Microbe Interact, 25(10), pp. 1361–1369. doi: 10.1094/MPMI-01-12-0014-R.

Yang, Q. *et al.* (2013) 'Development of a novel ex vivo porcine skin explant model for the assessment of mature bacterial biofilms', *Wound Repair and Regeneration*, 21(5), pp. 704–714. doi: 10.1111/wrr.12074.

Yuk, M. H., Harvill, E. T. and Miller, J. F. (1998) 'The BvgAS virulence control system regulates type III secretion in *Bordetella bronchiseptica*.' , *Molecular microbiology*, 28(5), pp. 945–59. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9663681> (Accessed: 25 June 2019).

Zaynagetdinov, R. *et al.* (2013) 'Identification of Myeloid Cell Subsets in Murine Lungs Using Flow Cytometry', *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 49(2), pp. 180–189. doi: 10.1165/rcmb.2012-0366MA.

Zhao, S. *et al.* (2014) 'Comparison of RNA-Seq and Microarray in Transcriptome Profiling of Activated T Cells', *PLoS ONE*. Edited by S.-D. Zhang. Public Library of Science, 9(1), p. e78644. doi: 10.1371/journal.pone.0078644.