



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

**Caracterización de una diguanilato ciclasa en la patogénesis de
*Bordetella bronchiseptica***

Tesista: Lic. Belhart Keila

Directora: Dra. Fernández Julieta

Año: 2022

Caracterización de una diguanylatto ciclase en la patogénesis de *Bordetella bronchiseptica*

El presente trabajo de tesis, para optar el título de Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado bajo la dirección de la Dra. Julieta Fernández en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular de La Plata (IBBM, UNLP-CONICET)

Mi reconocimiento

A la Universidad Nacional de la Plata (UNLP) y en particular a la Facultad de Ciencias Exactas por permitirme realizar este trabajo de investigación y por otorgarme las becas que posibilitaron mi dedicación exclusiva a este proyecto.

Al Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM-CONICET-UNLP) y a su director, Antonio Lagares, por permitirme utilizar sus instalaciones y el equipamiento.

A la Universidad Estatal Luisiana (LSU Health Shreveport) por permitirme llevar a cabo una pasantía de investigación en su institución y a la Unión Internacional de Bioquímica y Biotecnología (IUBMB) por financiar parte de mi estadía.

Agradecimientos

El desarrollo de esta tesis no hubiese sido posible sin un gran número de personas que directa o indirectamente me acompañaron. Por ello quiero expresar mi agradecimiento a:

La Dra. Julieta Fernández y al Dr. Federico Sisti porque me guiaron en este camino, me ayudaron en el planteo, la ejecución y la discusión de los experimentos. Gracias por su dedicación permanente y su compromiso asumido.

La Dra. Mónica Gestal por darme la posibilidad de trabajar en su laboratorio.

Al grupo VacSal y a mis compañeros de trabajo por haber compartido lindos años juntos.

Al grupo de VV, RPS y R3 por su ayuda permanente.

Y a todos ellos que están siempre apoyándome: mamá, papá, mis hermanos, mis hermanas, y a toda mi familia (que son muchos más!), mis amigos y amigas, y a mi gran compañero de la vida: Nico.

Abreviaturas

PRN: Pertactina

Fim: Fimbria

FHA: Hemaglutinina filamentosa

CyaA: Adenilato ciclasa

Tdn: Toxina dermonecrótica

SST3: Sistema de secreción tipo 3

LPS: lipopolisacárido

DI50: Dosis infectiva 50

UFC: Unidades formadoras de colonias

RGD: Arginina lisina aspártico

Vags: virulence activated genes

Vrgs: virulence repressed genes

c-di-GMP: diguanilato cíclico

MOI: Multiplicidad de infección

AN: Ácido nicotínico

BACTH: Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System

DO: Densidad óptica

ABS: Absorbancia

HA: Epitope de hemaglutinina

Str: Estreptomina

Gm: Gentamicina

Km: Kanamicina

Cb: Carbenicilina

Kd: constante de disociación

pb: pares de bases

SFB: suero fetal bobino

LDH: lactato deshidrogenasa

PNGA: poli- β -1-6-N-acetil-D-glucosamina

PVC: policloruro de Vinil

Índice

Capítulo 1: Introducción general.....	8
Género <i>Bordetella</i>	9
<i>Bordetellas</i> clásicas, relación filogenética.....	10
<i>B. bronchiseptica</i> como modelo de estudio de las <i>Bordetellas</i> clásicas.....	12
Factores de virulencia.....	12
Adhesinas.....	12
Toxinas.....	15
Sistema de Secreción tipo 3 (SST3).....	16
Sistema BvgAS.....	18
Patogenia de <i>Bordetella</i>	23
Infección en animales.....	23
Sobrevida intracelular.....	25
Formación de biofilm en <i>B. bronchiseptica</i>	26
Sistema de señalización por c-di-GMP.....	31
Diguanylató ciclasas.....	32
Mecanismos de activación e inhibición.....	33
Fosfodiesterasas.....	34
Proteínas con dominios GGDEF y EAL o HD-GYP.....	34
Receptores de c-di-GMP.....	35
Mecanismos de regulación.....	36
Mecanismos de regulación de c-di-GMP en <i>B. bronchiseptica</i>	38
Hipótesis, objetivo general y objetivos específicos.....	40
Capítulo 2: Análisis <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> de BdcB.....	41
Introducción.....	42
Análisis <i>in silico</i> de BdcB.....	43
Análisis de la región N-terminal.....	46
Análisis <i>in silico</i> del dominio GGDEF de BdcB.....	46
Análisis <i>in silico</i> del motivo <i>coiled coil</i> de BdcB.....	49
Análisis <i>in vitro</i> de la posible actividad diguanylató ciclasa de BdcB.....	52
-Expresión heteróloga de <i>bdcB</i> en <i>P. fluorescens</i>	52
-Sobreexpresión de BdcB en <i>B. bronchiseptica</i>	55
Análisis de la región N-terminal en BdcB <i>in vivo</i>	58
Discusión.....	60
Capítulo 3: Rol de BdcB en la movilidad y la formación de <i>biofilm</i> en <i>B. bronchiseptica</i>.....	64
Introducción.....	65
Análisis del rol de BdcB en la movilidad tipo <i>swimming</i>	66
Análisis del rol BdcB en la formación de <i>biofilm</i> en <i>B. bronchiseptica</i>	68
-Ensayos de formación de <i>biofilm</i> en microplacas de PVC.....	68
-Ensayos de formación de <i>biofilm</i> en vidrio y polipropileno.....	70

Discusión	75
Capítulo 4: Rol de BdcB en la sobrevida intracelular de <i>B. bronchiseptica</i>	78
Introducción	79
Ensayo de sobrevida intracelular en macrófagos Raw 264.7	80
Análisis de expresión de <i>bdcB</i> dentro de macrófagos	82
Caracterización de los factores de virulencia en <i>BbΔbcdB</i>	83
Análisis del rol de BdcB en la respuesta a estrés oxidativo y de pH	85
Resistencia de <i>BbΔbcdB</i> al peróxido de hidrógeno	85
Crecimiento a pH ácido	86
Ensayo de muerte a pH= 4	88
Discusión	91
Capítulo 5: Rol de BdcB en la citotoxicidad de <i>B. bronchiseptica</i>	95
Introducción	96
Estudio del rol de BdcB en la citotoxicidad de <i>B. bronchiseptica</i> sobre macrófagos	96
Análisis del Sistema de secreción tipo 3	102
Análisis de los reguladores del SST3	105
Estudio del rol de BdcB en respuesta inmune generada por los macrófagos en contacto con <i>B. bronchiseptica</i>	106
Discusión	110
Capítulo 6: Rol de BdcB en la colonización de las vías respiratorias en modelos de infección murinos	114
Introducción	115
Rol de BdcB en la colonización de las vías respiratorias	116
Análisis de la respuesta inmune en la cavidad nasal	119
Análisis de la respuesta inmune en pulmón	122
Discusión	128
Capítulo 7: Conclusiones generales	132
Conclusiones generales	133
Capítulo 8: Materiales y métodos	140
Cepas, condiciones de crecimiento y almacenamiento	141
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	141
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	142
<i>Escherichia coli</i>	143
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	143
Técnicas empleadas	144
Amplificación por PCR	144
Clonado con enzimas de restricción (digestiones y ligaciones)	144
Clonado en levaduras	145
Preparación de bacterias electrocompetentes	146
Electrotransformaciones	147
Extracción de ADN plasmídico, Miniprep	147

Electroforesis en geles de agarosa	148
Conjugaciones.....	148
Método de selección con sacarosa	149
Ensayos de formación de <i>biofilm</i> en <i>P. fluorescens</i>	150
Ensayos de formación de <i>biofilm</i> de <i>B. bronchiseptica</i> en placas multipocillos	150
Tinción con cristal violeta.....	150
Formación de <i>biofilm</i> en tubos de plástico y en vidrio	151
Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	151
Ensayos de movilidad	152
Doble híbrido en bacteria (BACTH).....	152
Ensayos de sobrevivencia con peróxido de Hidrógeno	153
Prueba de difusión por discos con peróxido de Hidrógeno.....	153
Cinética de crecimiento a pHs ácidos	153
Resistencia a pH ácido	154
Electroforesis en SDS-PAGE.....	154
<i>Western blot</i>	155
Extracción de ARN	155
qRT-PCR.....	156
Obtención de macrófagos a partir de medula ósea.....	157
Recuento de células.....	157
Medida de la liberación de la enzima lactato-deshidrogenasa	157
Medida de muerte celular con Ioduro de Propidio.....	158
Cuantificación de citoquinas y quimioquinas	158
Ensayos de fagocitosis en macrófagos obtenidos de ratones BALB/c y en macrófagos Raw 264.7	159
Modelo murino de infección.....	160
Herramientas bioinformáticas	160
Análisis Estadístico	161
Anexo 1: Medios de Cultivo	162
Anexo 2: Soluciones empleadas	164
Anexo 3: Plásmidos empleados	168
Anexo 4: <i>Primers</i> utilizados	169
Capítulo 9: Bibliografía.....	172
Bibliografía	173

Capítulo 1: Introducción general

Género *Bordetella*

Las bacterias del género *Bordetella* son cocobacilos gran negativos pertenecientes a la familia *Alcaligenaceae*, orden *Burkholderiales*, clase β -*proteobacterias*¹.

Actualmente, el género *Bordetella* comprende 17 especies. Las tres primeras especies de este género en ser aisladas y caracterizadas fueron *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*. Por su relevancia como patógenos respiratorios de humanos y otros mamíferos a estas tres especies se las conoce colectivamente como las *Bordetellas* clásicas¹⁻⁴.

B. pertussis es un patógeno exclusivo de humanos. Es el agente causal de la tos convulsa, una enfermedad respiratoria aguda altamente contagiosa que se transmite de persona a persona a través de gotitas respiratorias en aerosol⁵. Es especialmente grave en niños no vacunados^{6,7}. En los lactantes (menores de 1 año), esta enfermedad puede tomar un curso grave con bacterias que se diseminan a los pulmones causando bronquiolitis necrosante, hemorragia intraalveolar y edema fibrinoso. En casos severos, ocurre linfocitosis extrema, que se correlaciona positivamente con hipertensión pulmonar intratable, insuficiencia respiratoria y muerte⁸. En contraste con la posible fatalidad de la tos convulsa en bebés y niños pequeños, los adolescentes y adultos desarrollan tos persistente con menos manifestaciones sistémicas de la enfermedad⁹⁻¹³. A pesar de la vacunación generalizada, *Bordetella pertussis*, todavía sigue siendo una preocupación a nivel mundial ya que sigue afectando a decenas de millones de personas y causando cientos de miles de muertes por año, principalmente en niños menores de 5 años¹⁴.

En cuanto a *B. parapertussis*, se puede dividir en dos linajes genéticamente distintos, los que infectan a los seres humanos (*B. parapertussis hu*), causando una enfermedad similar a la que causa *B. pertussis* pero con una duración más corta, y los que causan infecciones crónicas en el tracto respiratorio de las ovejas (*B. parapertussis ov*)^{15,16}.

B. bronchiseptica, objeto de estudio de este trabajo, a diferencia del resto de las *Bordetellas* clásicas, presenta un rango amplio de huéspedes. Infecta cerdos causándoles rinitis atrófica, una enfermedad en la que los cerdos afectados no engordan y desarrollan atrofia de las fosas nasales y cornetes etmoidales^{1,17-19}. La infección de *B. bronchiseptica* en estos animales es una de las más estudiadas ya que conlleva a pérdidas económicas muy grandes. *B. bronchiseptica* también es capaz de infectar animales domésticos como perros y gatos. En los perros, la infección puede provocar traqueobronquitis infecciosa o tos de las perreras²⁰. Los perros severamente afectados suelen manifestar una tos seca, ronca, en ocasiones seguida de vómito, pudiendo el síndrome durar de 1 a 2 semanas. En los casos más graves, la enfermedad puede derivar en una neumonía seguida de muerte¹. En gatos, la infección con *B. bronchiseptica* genera síntomas similares a la infección en perros. A veces resulta en la muerte particularmente en gatos jóvenes cuando la enfermedad progresa rápidamente a bronconeumonía²¹.

Capítulo 1

En el laboratorio, la infección experimental de ratas, ratones y conejos puede producir desde secreción nasal, estornudos, pérdida de apetito y pérdida de peso hasta bronconeumonía y septicemia^{1,4,22}.

B. bronchiseptica también es capaz de infectar a humanos, especialmente a personas inmunocomprometidas, como pacientes con HIV, o personas inmunocompetentes que estuvieron en contacto estrecho con animales infectados²³. Incluso se han reportado casos con transmisión de persona a persona²⁴. Los individuos infectados presentan una sintomatología que es similar a la tos convulsa causada por *B. pertussis*, aunque más leve.

Un sello distintivo de las infecciones por *B. bronchiseptica* es el estado de portador asintomático a largo plazo o de por vida. Los animales portadores continúan transmitiendo la bacteria, infectando así a los animales susceptibles²⁵⁻²⁷.

En contraste con las *Bordetellas* clásicas estrechamente relacionadas, se han identificado varias especies de *Bordetella* con una diversidad genética más amplia, denominadas colectivamente como *Bordetellas* no clásicas: *B. holmesii*²⁸, *B. trematum*²⁹, *B. petrii*³⁰, *B. ansorpii*³¹, *B. sputigena*³², *B. bronchialis*³², *B. flabilis*³², *B. avium*³³, *B. hinzii*^{32,34}, *B. pseudohinzi*³⁵, *B. muralis*³⁶, *B. tumbae*³⁶, *B. tumulicola*³⁶ y *B. atropi*³⁷. A diferencia de las *Bordetellas* clásicas, que infectan y causan enfermedades del tracto respiratorio de sus huéspedes naturales, las especies no clásicas se asocian con una amplia gama de enfermedades. Por ejemplo, mientras que *B. holmesii* y *B. avium* causan enfermedades respiratorias, *B. trematum* y *B. ansorpii* se han aislado de infecciones de heridas. *B. hinzii* causa enfermedades respiratorias en las aves de corral^{29,38} y se ha asociado con infecciones en humanos inmunocomprometidos, incluyendo bacteriemia³⁴, septicemia, enfermedades respiratorias y colangitis crónica. La última especie de *Bordetella* aislada, *B. atropi* ha sido descrita como un patógeno intestinal de nematodos³⁷.

***Bordetellas* clásicas, relación filogenética**

El secuenciamiento a gran escala y la comparación de los genomas de las *Bordetellas* clásicas (*B. pertussis* cepa Tohama 1, *B. parapertussis* hu cepa 12822 y *B. bronchiseptica* cepa RB50) han permitido profundizar en algunos aspectos relativos a la evolución y diferenciación de estas especies^{39,40}. El genoma de *B. bronchiseptica* presenta un tamaño más grande e incluye casi todos los genes presentes en *B. pertussis* y *B. parapertussis*. Su genoma es de 5.3Mb, mientras que, los genomas de *B. pertussis* Tohama I y el de *B. parapertussis* 12822 son de 4.09Mb y 4,77 Mb, respectivamente. Esta diferencia de tamaños y las características más sobresalientes de los genomas (Tabla 1.1) respaldan la hipótesis de que *B. pertussis* y *B. parapertussis* evolucionaron de forma reciente e independiente a partir de un ancestro común próximo a *B. bronchiseptica*^{3,16,40}.

Propiedades	<i>B.pertussis</i> Tohama I	<i>B. parapertussis</i> 12822	<i>B. bronchiseptica</i> RB50
Tamaño de genoma (pb)	4.086.186	4.773.551	5.338.400
Número de secuencias codificantes	3.816	4.404	5.007
Número de pseudogenes (% secuencias codificantes)	358 (9,4%)	220 (5,0%)	18 (0,4%)
Contenido en G+C (%)	67,72	68,10	68,07
Secuencias de Inserción (número de copias)	IS481 (238) IS1001(0) IS1002 (6) IS1663 (17)	IS481 (0) IS1001(22) IS1002 (90) IS1663 (0)	IS481 (1) IS1001(0) IS1002 (0) IS1663 (0)

Tabla 1.1: Características genómicas de cepas de referencia de las *Bordetellas* clásicas. Tabla adaptada de Julian Parkhill et. al. 2003⁴⁰.

El proceso de evolución habría estado caracterizado principalmente por la expansión de secuencias de inserción (IS). Estos elementos IS están presentes en *B. bronchiseptica*, pero solo en unas pocas copias por genoma. En contraste, *B. pertussis* y *B. parapertussis* han sufrido una gran expansión en el número de copias de IS, predominantemente IS481 (238 copias) e IS1663 (17 copias) en *B. pertussis* e IS1001 (22 copias) e IS1002 (90 copias) en *B. parapertussis*. Esta expansión de los elementos IS ha permitido la recombinación homóloga a lo largo de estos genomas y dicha recombinación ha dado como resultado delecciones y reordenamientos intragenómicos.

La presencia de los elementos IS sumado a mutaciones de corrimientos de marco o de codones de stop en marco, entre otras, han dado lugar también a la aparición de 358 y 200 pseudogenes en *B. pertussis* y *B. parapertussis* respectivamente. Todo esto indicaría que *B. pertussis*, en comparación con *B. parapertussis*, habría experimentado niveles mucho mayores de pérdida de genes y reordenamiento del genoma, lo que es consistente con que *B. parapertussis* se separó de su antepasado *B. bronchiseptica* más recientemente que *B. pertussis*⁴⁰.

A pesar de estas diferencias, estas tres especies comparten gran porcentaje de su genoma y su estrecha relación filogenética queda reflejada por la similitud en el conjunto de factores de virulencia que expresan y por el alto grado de identidad que existe entre estos. Entre los principales factores de virulencia que comparten estas tres especies se encuentran diferentes adhesinas como la Hemaglutinina Filamentosa (FHA), pertactina (PRN) y las fimbrias (Fim), y toxinas con diferentes actividades citotóxicas e inmunomodulatorias como la toxina adenilato ciclasa (CyaA), la citotoxina traqueal (TCT) y la toxina dermonecrótica (Tdn)⁴⁰⁻⁴².

***B. bronchiseptica* como modelo de estudio de las *Bordetellas* clásicas**

Las estrechas relaciones filogenéticas, en combinación con la conservación de muchos factores de virulencia entre las *Bordetellas* clásicas y el hecho de que *B. bronchiseptica* sea un patógeno natural de animales de experimentación ha llevado a varios grupos de investigación, incluido el nuestro, a utilizar la infección de huéspedes naturales por *B. bronchiseptica* para estudiar las características más sobresalientes de la patogenia que son comunes a *B. pertussis* y *B. parapertussis hu*⁴³.

Las infecciones con *B. pertussis* y *B. parapertussis hu* están restringidas a los humanos y se requieren grandes dosis infecciosas para la colonización del tracto respiratorio en modelos animales de laboratorio. Por el contrario, los conejos, ratas y ratones inoculados por vía intranasal mediante la administración de una gota de 5 µl de un cultivo de *B. bronchiseptica* se colonizan persistentemente en la cavidad nasal, la laringe, la tráquea y los pulmones. De hecho, la dosis infectiva 50 (DI50) intranasal para conejos, ratas y ratones es inferior a 200, 25 y 5 unidades formadoras de colonias (UFC), respectivamente, lo que indica la capacidad de estos sistemas modelo para reflejar con precisión las características de la infección natural⁴⁴⁻⁴⁸.

El estudio de la patogenia de *B. bronchiseptica* también tiene importancia veterinaria y clínica ya que, como se mencionaba anteriormente, *B. bronchiseptica* es un patógeno común de los animales domésticos^{49,50} y ocasionalmente causa enfermedades en humanos²³. Estos modelos han revelado funciones para varios determinantes de virulencia conservados y factores reguladores, y se ha demostrado que varios de estos factores son funcionalmente intercambiables entre las *Bordetellas* clásicas⁵¹⁻⁵³, validando el uso de *B. bronchiseptica* como modelo para estudiar la patogénesis de estas especies y su interacción con el huésped.

Por lo tanto, *B. bronchiseptica* ha sido y lo es aún hoy en día un excelente modelo de estudio de la interacción patógeno huésped.

Factores de virulencia

Entre los factores de virulencia que han sido descriptos importantes para la colonización de estas tres especies se encuentran adhesinas, toxinas y sistemas de secreción. A continuación, se detallan las características más sobresalientes.

Adhesinas

Hemaglutinina Filamentosa (FHA)

FHA es considerada como la adhesina más importante de *Bordetella spp.* Está codificada en el gen *fhaB*. Se sintetiza como precursor llamado FhaB de 367 kDa y luego de una serie de modificaciones post-

Capítulo 1

traduccionales en la que es clivado por tres proteasas en los extremos N- y C- terminales termina formando una proteína madura de 220 kDa⁵⁴. Como su nombre lo sugiere, FHA presenta una estructura filamentosa de 2 nm de diámetro y 45-50 nm de longitud, organizada estructuralmente en 19 hojas β -plegadas que forman una estructura del tipo barril- β que atraviesa la membrana externa de la bacteria^{55,56}. Exhibe varios sitios de unión diferentes que la implican como una adhesina importante. Presenta un motivo de aminoácidos RGD (Arginina,R, glicina,G, aspártico,D) que promueve la adhesión a los monocitos, macrófagos, leucocitos polimorfonucleares (PMNs) y otros tipos celulares⁵⁷⁻⁵⁹. Entre los residuos 1141 y 1279 de FHA se encuentra un dominio tipo lectina denominado dominio CRD (dominio de reconocimiento de carbohidratos). Este dominio posee una afinidad particular por carbohidratos y glicolípidos de células ciliadas y macrófagos lo que permitiría la adherencia a los cilios⁶⁰. Entre los aminoácidos 442-863 se encuentra un dominio tipo lectina a través del cual puede unirse a heparina y glicolípidos sulfatados no cargados que se encuentran en la superficie de las vías respiratorias⁶¹.

Estudios *in vitro* con FHA han demostrado que además de funcionar como una adhesina es capaz de provocar respuestas proinflamatorias y proapoptóticas en células similares a macrófagos THP-1, macrófagos derivados de monocitos (MDM) de sangre periférica humana y células epiteliales bronquiales humanas BEAS-2B⁶².

Los ensayos de infección en animales demuestran que esta adhesina es requerida para la colonización del tracto respiratorio inferior^{63,64}. Adicionalmente, el mutante en FHA induce una respuesta inflamatoria más potente, caracterizada por altos niveles de la citoquina proinflamatoria interleucina (IL)-1 β , y las quimioquinas de neutrófilos y macrófagos KC y MCP-1, respectivamente, en los pulmones en los primeros días después de la inoculación en comparación con bacterias de tipo salvaje^{65,66}. Sugiriendo con esto que FHA sería importante para suprimir la respuesta inflamatoria inicial y facilitar de esta manera la persistencia de *B. bronchiseptica* en el huésped.

Fimbrias (Fim)

Son miembros de la familia pili tipo I. Presentan un diámetro de ~7,5 nm y pueden tener varios cientos de nanómetros de longitud⁶⁷. Estas estructuras están compuestas por una subunidad principal, que adquiere una estructura tipo varilla, y una subunidad menor, que conforma la punta de la adhesina. Los genes que codifican las dos subunidades principales fimbriales son, *fim2* y *fim3* aunque, *B. bronchiseptica*, expresa también las subunidades principales (FimX, FimN y FimA). Todos los serotipos de fimbria comparten como subunidad menor a FimD. FimD está codificada en el operón *fimBCD*, donde también se encuentran los genes que codifican para FimB y FimC, los cuales estarían implicados en el ensamblado y

secreción de FimD. El operón *fimBCD* se encuentra entre los genes *fhaB* y *fhaC* lo cual sugiere un carácter co-transcripcional entre la fimbria y la adhesina FHA⁶⁸.

La ausencia de Fimbrias en cepas de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* reduce la capacidad de colonización de estas bacterias en el tracto respiratorio de ratones y provoca una respuesta inflamatoria más fuerte respecto de las cepas silvestres, que se caracteriza por un mayor reclutamiento de células inflamatorias y un nivel mayor de IL-1 β en los pulmones de los ratones infectados⁶⁹⁻⁷¹.

Pertactina y proteínas autotransportadoras

La familia de autotransportadores incluye proteínas funcionalmente diversas, como proteasas, adhesinas, toxinas, y lipasas, que parecen dirigir su propia exportación a la membrana externa⁷². El primer miembro de la familia de autotransportadores identificado y caracterizado en *Bordetella* es la pertactina (PRN). La PRN madura es una proteína de 68 kDa en *B. bronchiseptica*⁷³, 69 kDa en *B. pertussis*⁷⁴ y 70 kDa en *B. parapertussis* (hu)⁷⁵. Al igual que todos los autotransportadores que se encuentran en los patógenos gramnegativos, PRN tiene tres dominios funcionales: la secuencia señal N-terminal, el dominio pasajero y un dominio autotransportador C-terminal. La secuencia señal guía a los dominios pasajero y transportador hacia el periplasma, lo que permite que el dominio transportador forme un poro en la membrana externa para la translocación del dominio pasajero a la superficie celular. Luego, la proteína es escindida por una proteasa de la membrana externa, y el dominio pasajero permanece en contacto con la superficie mediante interacciones no covalentes^{76,77}.

Se ha propuesto que PRN desempeña un papel en la adherencia, ya que contiene el motivo tripéptido RGD, así como varias regiones ricas en prolina y en leucina, motivos comúnmente presentes en moléculas involucradas en la unión a células eucariotas⁷⁸.

Otras proteínas de *B. bronchiseptica* con capacidad de autotransporte prevista incluyen BrkA⁷⁹, SphB1⁸⁰ y Vag8⁸¹. Todas estas proteínas muestran una similitud de secuencia de aminoácidos significativa en sus extremos C-terminales y contienen uno o más motivos tripéptidos RGD.

Toxinas

La toxina adenilato ciclasa (CyaA)

CyaA es miembro de la familia de citotoxinas formadoras de poros dependientes de calcio conocidas como toxinas RTX (del inglés *repeats in toxin*). Estas toxinas comparten un motivo de unión de calcio de repeticiones en tándem de nueve aminoácidos (LXGGXG(N/D)DX) ricos en glicina y aspartato^{82,83}.

La adenilato ciclasa está codificada en el gen *cyaA* el cual se encuentra dispuesto en el operón *cyaABDE* junto a los genes que codifican para CyaB, CyaD y CyaE implicados en la activación y secreción de CyaA. El polipéptido CyaA se sintetiza como una protoxina inactiva de 1706 aminoácidos que se convierte en una toxina activa mediante palmitoilación postraduccional de dos lisinas internas (lisinas 856 y 963)^{84,85}.

Esta toxina presenta dos módulos funcionales distintos: un módulo que comprende la actividad hemolisina y otro módulo correspondiente con su actividad adenilato ciclasa.

La región implicada en la actividad hemolisina se dispone en el extremo C-terminal y es comprendida por aproximadamente 1300 aminoácidos. Esta región es la responsable de formar poros en las membranas de los eritrocitos desencadenando así su hemólisis. Este dominio es responsable también de la adhesión e internalización del dominio adenilato ciclasa dentro de la célula eucariota^{86,87}.

La región con actividad adenilato ciclasa se dispone en los primeros 400 aminoácidos del extremo N-terminal. Una vez traslocado este dominio dentro de la célula del huésped convierte el ATP en AMP cíclico (AMPC) de una manera dependiente de calmodulina. La actividad adenilato ciclasa conduce a niveles supra fisiológicos de AMPC y una reducción masiva del ATP intracelular⁸⁸⁻⁹².

El aumento en los niveles de AMPC intracelular en neutrófilos o macrófagos conduce a una inhibición de la quimiotaxis y funciones bactericidas como la capacidad fagocítica y la generación de las especies reactivas de oxígeno, lo cual favorece la supervivencia bacteriana en la interacción con la célula huésped⁹³⁻⁹⁵. Además, CyaA puede desencadenar la apoptosis de los macrófagos *in vitro*^{96,97} e *in vivo*^{98,99}.

Adicionalmente, esta toxina modula la respuesta inmune del huésped actuando sobre distintas células y afectando la producción de citoquinas. En células dendríticas y macrófagos en presencia de LPS estimula la producción de las citoquinas IL-6 e IL-10 mientras inhibe la producción de las citoquinas IL-12, TNF- α y de la quimioquina CCL3¹⁰⁰.

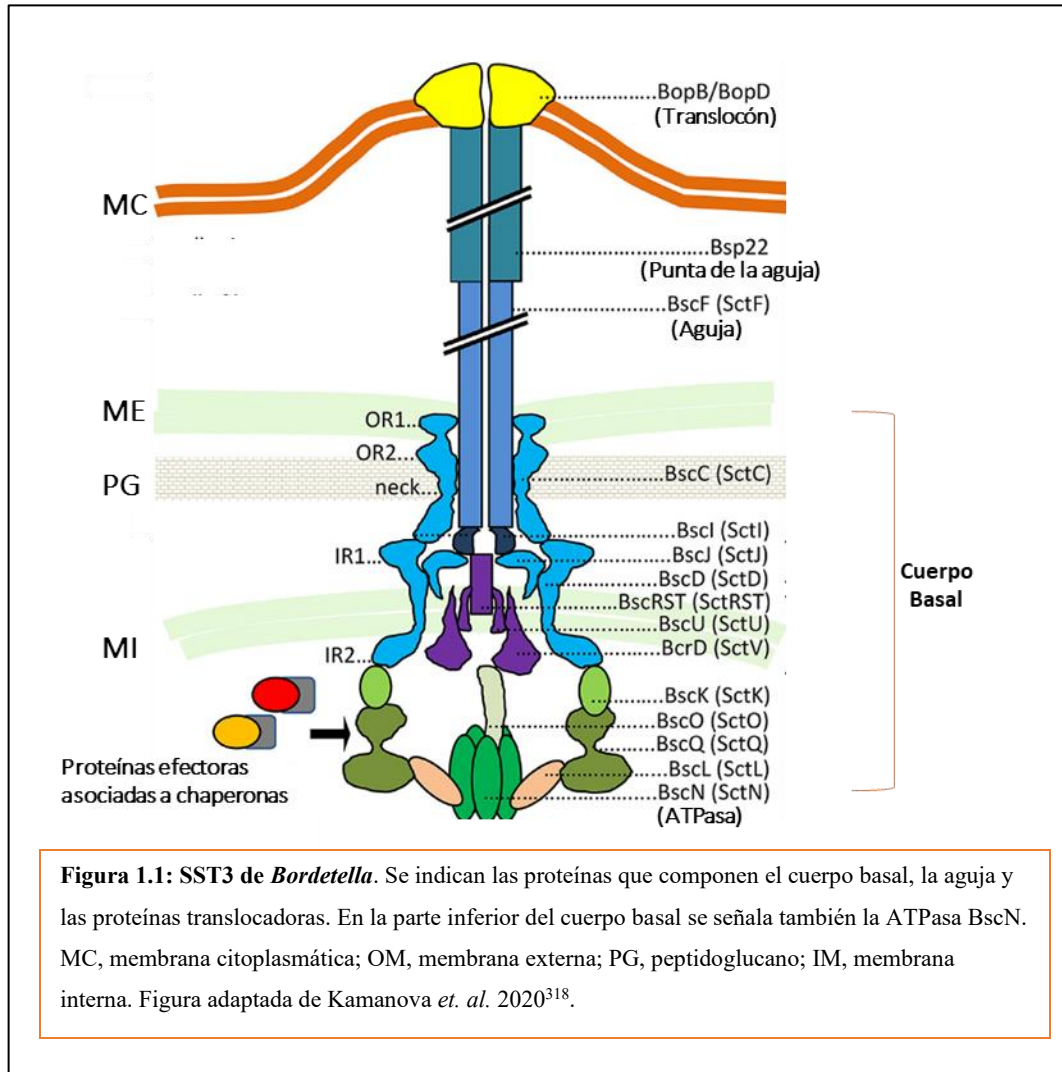
La toxina dermonecrótica (Tdn)

Tdn de *Bordetella* consta de 1.464 aminoácidos y pertenece a la familia de las A-B toxinas. En su extremo N-terminal se encuentra el dominio de unión a células eucariotas mientras que en el extremo C-terminal se encuentra la actividad catalítica de esta proteína. La toxina es una transglutaminasa que cataliza la poliamidación y la deamidación de las Rho GTPasas, las cuales regulan una variedad de procesos celulares, incluida la reorganización de los citoesqueletos de actina, la transcripción de ciertos genes y la diferenciación celular, entre otros¹⁰¹⁻¹⁰⁴. Como resultado de esto, las GTPasas se vuelven constitutivamente activas y, por lo tanto, hacen que las células intoxicadas expresen de manera aberrante los fenotipos dependientes de estas enzimas. Hasta el momento, es escaso el conocimiento con respecto al rol de la Tdn en la patogénesis de las distintas especies del género. No parece desempeñar un papel importante en la colonización¹⁰⁵, aunque sí es responsable de los daños óseos en los cornetes nasales característicos de la rinitis atrófica en cerdos¹⁰⁶.

Sistema de Secreción tipo 3 (SST3)

El SST3 es un sistema altamente regulado que les permite a las bacterias Gram negativas translocar proteínas efectoras dentro de las células eucariotas y alterar diferentes procesos celulares¹⁰⁷. La maquinaria del SST3 comprende un cuerpo basal que se extiende a través de la membranas interna y externa, una estructura similar a una aguja que sobresale de la membrana externa bacteriana, proteínas translocadoras (que se encuentran en la punta del filamento de la aguja, son translocadas dentro de la célula del huésped y forman un poro en su membrana) y las proteínas efectoras. A través de este sistema, las proteínas efectoras son traslocadas desde el interior de la bacteria hacia la célula huésped por el conducto del filamento de aguja y a través del poro formado por las proteínas translocadoras. Este proceso requiere de energía la cual es generada por una ATPasa que está localizada inmediatamente debajo del cuerpo basal. Mientras que los genes que codifican el aparato de secreción y las proteínas translocadoras están relativamente muy conservados entre los diferentes patógenos, las proteínas efectoras secretadas por estos sistemas son altamente diversas¹⁰⁸.

En las *Bordetellas* clásicas, el locus que codifica para los componentes del SST3 es el locus *bsc*, el cual se encuentra altamente conservado entre las tres especies. Este locus incluye 22 genes que codifican componentes del SST3 entre los que se encuentran componentes del cuerpo basal, el filamento, las proteínas translocadoras, la ATPasa BscN y posibles chaperonas. En la figura 1.1 se muestra una representación del SST3 en *B. bronchiseptica*.



Dentro de las proteínas del locus *bsc* de *B. bronchiseptica* que han sido estudiadas y caracterizadas, además de la ATPasa BscN, se encuentran: Bsp22, BopB, BopN y BopD. Las proteínas BopB y BopD forman los poros en la membrana huésped¹⁰⁹, y Bsp22 forma un canal de conexión largo y flexible que une el filamento de la aguja con BopD¹¹⁰. En cuanto a BopN muestra similitud de secuencia con YopN de *Yersinia pestis*, y es una de las proteínas efectoras del SST3.

Adicionalmente, se ha identificado una segunda proteína efectora del SST3 codificada por el gen *bteA* ubicado por fuera del locus *bsc*. BteA es requerida para las actividades citotóxicas de la bacteria, incluida la muerte celular en las células del huésped¹¹¹.

Recientemente, se identificó un locus adicional situado *downstream* del locus *bsc*, el locus *btr*, el cual codifica para proteínas reguladoras del SST3 de *Bordetella*¹¹². Entre estas proteínas se encuentran BtrS que es requerida para la expresión del locus del SST3, BtrV que es esencial para la traducción y/o la

Capítulo 1

estabilidad de las proteínas del SST3 y BtrU y BtrW que son importantes para la secreción del sistema. Dentro de este locus también está codificada BtrA, un factor anti-sigma, que podría interactuar con BtrS para impedir su acción estimuladora de la expresión del SST3¹⁰⁸. En este sentido, la delección de *btrA* induce la sobreexpresión de las proteínas efectoras en *B. bronchiseptica*¹⁰⁸.

El SST3 es regulado a su vez por otros sistemas externos al locus propio. El sistema de dos componentes BvgAS (ver más abajo) regula la expresión del locus *bsc*⁴⁴ y, en *B. pertussis*, también se ha descrito la participación de la chaperona Hfq en esta regulación¹¹³.

In vitro, *B. bronchiseptica* provoca una muerte celular rápida en macrófagos y líneas de células epiteliales de una manera dependiente del SST3¹¹⁴. El SST3 también evita la translocación del factor de transcripción NF-κB al núcleo incluso en presencia de la estimulación de las células con el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α); en cambio, provoca una agregación aberrante de NF-κB dentro del citoplasma de la célula huésped¹¹⁴.

Por otro lado, el SST3 actúa junto con la toxina CyaA para modular a las células dendríticas a un estado semi-maduro, mediante la estimulación de la producción de IL-10 y prostaglandina (PGE2) dando lugar a una respuesta del tipo T regulatoria¹¹⁵. Asimismo, CyaA junto con el SST3 inducen en macrófagos la producción de IL-17 y de citoquinas antiinflamatorias por parte de células T dirigiendo así una respuesta del tipo Th17¹¹⁶.

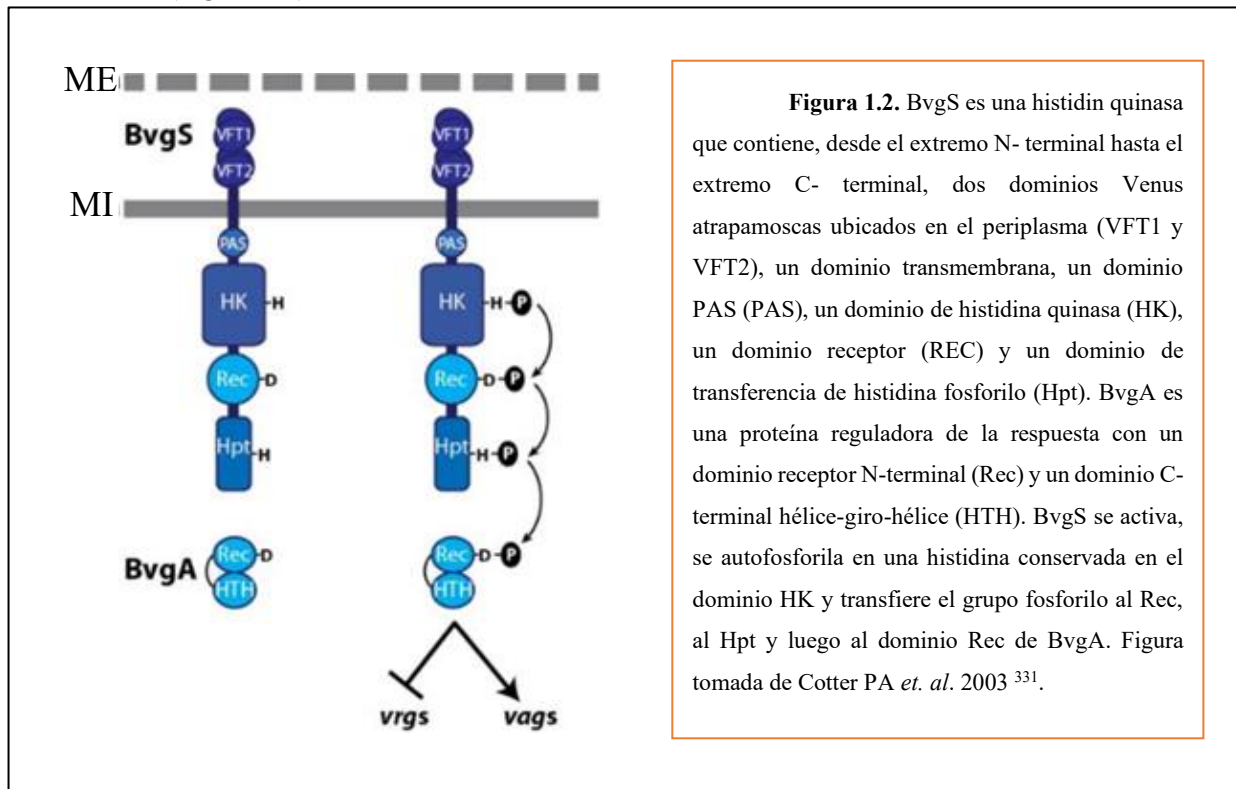
In vivo, el SST3 de *B. bronchiseptica* contribuye a la colonización persistente de la tráquea en modelos de infección respiratoria en ratas y ratones^{44,114}. Las células inflamatorias que se infiltran en los pulmones durante la infección sufren apoptosis en ratones infectados con una cepa de tipo salvaje, pero no en aquellos infectados con una cepa mutante deficiente en el SST3¹¹⁴. Además, los ratones infectados con esta cepa deficiente obtienen títulos más altos de anticuerpos anti-*Bordetella* (específicamente IgA sérica) que los animales infectados con la cepa salvaje¹¹⁴.

Sistema BvgAS

Los factores de virulencia antes descritos no se expresan de manera constitutiva, sino que se encuentran bajo el control de un locus denominado *Bordetella virulence gene* (*bvg*) que codifica para el sistema de dos componentes BvgAS. Los primeros en describir este locus fueron Weiss y colaboradores quienes observaron que la inserción del transposón Tn5 en el locus *bvg* abolía de manera simultánea la expresión de los factores de virulencia, FHA, PRN, CyaA, Tdn y Fim (cuyos genes se denominan **vags** por sus siglas en inglés *virulence activated genes*)¹¹⁷.

El sistema de dos componentes BvgAS pertenece a la subfamilia de sistemas de dos componentes llamados sistemas no ortodoxos, que son estructuralmente más complejos que los sistemas de dos componentes estándar (Histidin quinasa (HK) y regulador de respuesta (RR)) y se caracterizan por una fosfotransferencia de cuatro pasos: His-Asp-His-Asp, que involucra dominios proteicos adicionales¹¹⁸⁻¹²⁰.

BvgS es una histidin quinasa de 134 kDa ubicada en la membrana citoplasmática y forma homodímeros (Figura 1.2)¹²¹.



Como se muestra en la Figura 1.2, el extremo N-terminal de BvgS está ubicado en el periplasma y contiene dos dominios receptores de la señal del tipo Venus atrapamoscas (VTF). A estos dos dominios le sigue un dominio transmembrana y un dominio tipo PAS que conectan el dominio periplásmico con tres dominios citoplasmáticos llamados transmisor (HK), receptor (Rec) y dominio dador de fosfatos (HPT)¹²².

El dominio transmisor presenta dos subdominios, un subdominio con un sitio de unión a ATP, que cuando se activa, cataliza la hidrólisis del ATP y transfiere el grupo fosfato al residuo de histidina conservado (H729) ubicado en el otro subdominio. Desde el residuo H729, el grupo fosforilo se transfiere posteriormente al ácido aspártico (D1023) y al residuo de histidina (H1172) en los dominios receptor y HPT, respectivamente. Por lo tanto, en BvgS se produce una fosfotransferencia intramolecular de varios pasos tras su activación. El dominio del receptor BvgS puede desempeñar un papel regulador importante en este proceso, ya que no solo puede transferir el grupo fosforilo al dominio HPT, sino que también interrumpe la

Capítulo 1

transferencia mediante la liberación hidrolítica del fosfato inorgánico retardando así la activación de BvgA^{123,124}. Desde el dominio HPt, el grupo fosforilo se transfiere al regulador de respuesta BvgA¹²⁵⁻¹²⁷.

BvgA es un factor de transcripción de 23 kDa que contiene en su N-terminal un dominio REC o receptor y en su región C-terminal un dominio HTH de unión a DNA^{128,129}. Se fosforila en un residuo de ácido aspártico (D54) ubicado en el dominio receptor y una vez fosforilado se une a las secuencias promotoras de una manera cooperativa, mostrando una afinidad fuertemente aumentada por sus secuencias blanco tras la fosforilación^{128,130}.

Dependiendo del estado de fosforilación de BvgA, este sistema no solo va a regular la expresión de los genes *vags* sino que en total regula diferencialmente 4 clases de genes: (I) *vags* tempranos, (II) *vags* tardíos, (III) genes de fase intermedia y (IV) los genes *vrgs* del inglés *virulence repressed genes*. Asimismo, la expresión de estos genes determina al menos tres fases de la bacteria conocidas como fases de virulencia: (a) Fase virulenta (o Bvg⁺), (b) fase intermedia (o Bvgⁱ), y (c) fase avirulenta o (Bvg⁻) (Figura 1.3). A continuación, se describe cómo ocurre esta regulación.

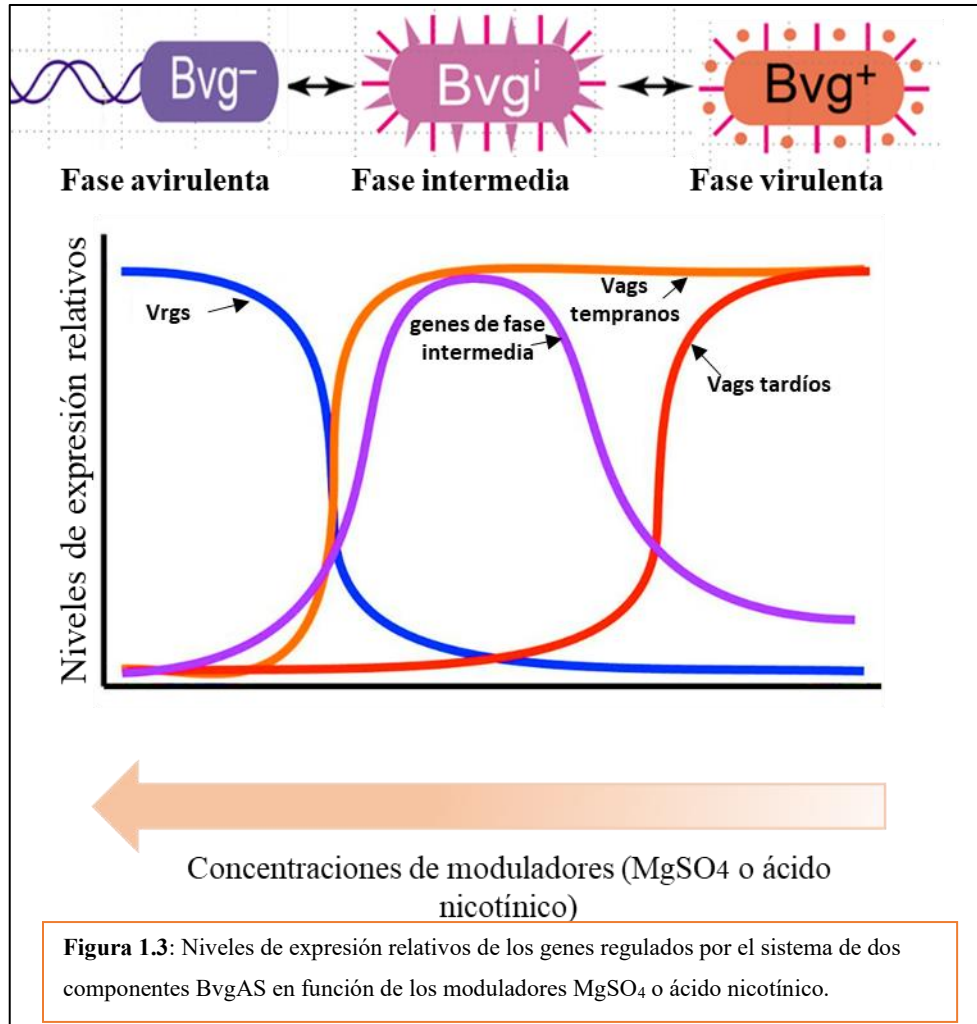


Figura 1.3: Niveles de expresión relativos de los genes regulados por el sistema de dos componentes BvgAS en función de los moduladores MgSO₄ o ácido nicotínico.

Fase virulenta o Bvg⁺. Esta fase se caracteriza por la expresión de los *vag* tempranos y los *vag* tardíos. En un escenario experimental en el que los niveles de BvgA~P están aumentando, los *vag* tempranos, como los genes que codifican para las adhesinas FHA y las fimbrias, se activan primero. En este momento, BvgA~P activa también al promotor del *vag* temprano *bvgR*, cuyo producto reprime los *vrgs* que se inducen en ausencia de BvgA~P¹³¹. A medida que aumentan los niveles de BvgA~P, también se activan las *vags* tardíos, como los genes de la toxina adenilato ciclasa, *cyaA*. Este control diferencial surge porque los promotores *vags* tempranos tienen menos sitios de unión a BvgA~P y más fuertes que los promotores *vags* tardíos.

La fase intermedia o Bvgⁱ. Representa un estado intermedio, con una concentración intermedia de BvgA~P en equilibrio con la forma no fosforilada. En esta condición los genes *vags* tempranos, como *fhaB* y *fim* se siguen expresando, sin embargo, los genes *vags* tardíos, como el gen *cyaA*, no se alcanzan a expresar. En esta fase también se expresan genes propios de esta fase como es el caso del gen que codifica para la adhesina BipA, que presentan un tipo de regulación un poco más compleja ya que son activados por

niveles de BvgA~P que activan genes *vags* tempranos, pero son reprimidos por los niveles más altos requeridos para la activación de los genes *vag* tardíos¹³². En el caso del gen *bipA*, se han descrito secuencias de unión a BvgA~P de alta y baja afinidad. Las secuencias de alta afinidad se encuentran *upstream* del gen y actuarían de igual manera que en *phaB*. Sin embargo, los sitios de unión de baja afinidad se encuentran ubicados *downstream* del inicio del gen *bipA*. La unión de BvgA~P a estos sitios impediría la transcripción del gen, probablemente impidiendo de manera estérica la unión de la ARN polimerasa al sitio de inicio de la transcripción. El balance entre las formas de BvgA fosforilado y sin fosforilar es lo que permite o no la expresión de BipA. Cuando la concentración de BvgA~P es alta tanto los sitios de alta como de baja afinidad se encuentran ocupados, por lo que el gen *bipA* no se expresa. Al descender el nivel de BvgA~P los sitios de baja afinidad son liberados y el gen de fase intermedia es expresado. Finalmente, una vez que la cantidad de BvgA~P haya descendido notablemente los sitios de alta afinidad serán liberados y el gen deja de ser expresado.

La fase avirulenta o Bvg⁻. Representa niveles muy bajos de BvgA~P. En estas condiciones, no se expresan los genes *vags* tempranos, *vags* tardíos y los genes de fase intermedia. Tampoco se produce el represor BvgR y en consecuencia sí se expresan los genes *vrgs*^{43,133}. La expresión de los *vrgs* resulta en la expresión máxima del locus de movilidad, los genes necesarios para la producción de ureasa¹³⁴ y varios genes implicados en procesos metabólicos y el transporte de aminoácidos.

Si bien no se conocen cuáles son las señales naturales que activan al sistema BvgAS, en el laboratorio se puede modular este sistema empleando la temperatura, o concentraciones milimolares de ácido nicotínico (AN) o de sulfato de magnesio. Análisis experimentales han demostrado que el crecimiento a 37 °C en bajas concentraciones de AN o sulfato de magnesio inducen a la bacteria a la fase virulenta. Temperaturas por debajo de 26 °C o la presencia de concentraciones milimolares de AN o sulfato de magnesio inducen la fase avirulenta. Mientras que la adición de sulfato de magnesio o AN a concentraciones más bajas que las necesarias para inducir plenamente la fase Bvg⁻, inducen la fase Bvg⁺ (Figura 1.3).

Mediante análisis mutacionales en el sistema BvgAS se ha analizado su implicancia *in vivo*. Estos estudios han demostrado que cepas mutantes en el sistema BvgAS que permanecen bloqueados en la fase virulenta (Bvg⁺), es decir, que expresan constitutivamente los factores de virulencia, muestran una capacidad de infección y colonización del tracto respiratorio en diversos animales indistinguible a la cepa silvestre. Mientras que, cepas mutantes en el sistema BvgAS bloqueados en fase avirulenta (Bvg⁻) son eliminados rápidamente del tracto respiratorio de los animales. Esto demuestra que la fase Bvg⁺ es necesaria y suficiente para la colonización del tracto respiratorio por *B. pertussis* y *B. bronchiseptica*^{48,135,136}.

Si bien la vinculación de la fase virulenta con la colonización ha sido estudiada y establecida por la comunidad científica, la literatura reciente ha demostrado que la regulación *in vivo* de los factores de

virulencia no es tan simple. Las condiciones a las que está sometida la bacteria dentro del huésped van cambiando y la bacteria se enfrenta continuamente a nuevos entornos con cambios de temperatura y condiciones de escasez de nutrientes, diferentes pHs y cambios de osmolaridad a los cuales la bacteria debe ir adaptándose y otros sistemas de dos componentes pueden participar de forma diferente en la regulación del sistema BvgAS para trabajar conjuntamente en la adaptación de *Bordetella* spp. a estos ambientes.

Se ha identificado el sistema de dos componentes RisAS (del inglés *regulator of intracellular response*) compuesto por la histina quinasa sensora (RisS) y el regulador de respuesta (RisA). Se ha visto que este sistema, cuya expresión es independiente del sistema BvgAS, es importante para la sobrevivencia intracelular de *B. bronchiseptica* y para la activación de los *vrgs*^{137,138}. Se ha postulado que RisA podría actuar de manera antagónica a BvgR en la regulación de los *vrgs*. BvgR podría estar reprimiendo la expresión de los *vrgs* impidiendo la unión de RisA a las regiones promotoras de dichos genes ya sea de forma directa compitiendo por la secuencia promotora o indirectamente mediante la unión a RisA^{137,139}.

Adicionalmente, se ha descrito otro sistema de dos componentes, el sistema PlrSR (del inglés *persistance in the low respiratory tract*), el cual responde a CO₂ y es importante para lograr la persistencia de *B. bronchiseptica* en el tracto respiratorio inferior. Se ha demostrado que este sistema es importante para activar y mantener activo al sistema BvgAS en los pulmones del ratón, pero no en la cavidad nasal^{140,141}. Sin embargo, el mecanismo por el cual ocurre esta activación es aún desconocido.

Por último, el regulador BvgR, inhibidor de la expresión de los genes *vrgs*, presenta en su estructura un dominio EAL que podría estar implicado en la regulación a través del segundo mensajero c-di-GMP¹³⁷.

Patogenia de *Bordetella* Infección en animales

La colonización de las vías respiratorias del huésped por parte de *B. bronchiseptica* transcurre a través una serie de etapas: adhesión, evasión del sistema inmune, proliferación dentro del huésped, y persistencia de la bacteria en el huésped^{4,142,143}.

En principio, las bacterias ingresan por las vías aéreas del huésped mediante gotitas o aerosoles que contienen al patógeno y una vez dentro del mismo se adhieren a los cilios de las células epiteliales de las vías respiratorias^{144,145}. Esta fase de adhesión constituye, como en toda infección, la etapa inicial y crítica de la colonización. Se han identificado varios factores implicados en la facilitación de la adhesión como son FHA, FIM, Vag8, el lipopolisacárido (LPS), y PRN, lo que evidencia una redundancia de proteínas adhesinas que pueden contribuir a este proceso. Como consecuencia de esta redundancia, las funciones adhesivas individuales a menudo quedan enmascaradas y ha sido difícil designar una proteína como adhesina primaria. Varios sistemas de modelos animales y sistemas de cultivo de tejidos dan diferentes resultados con respecto a la importancia de las diversas proteínas en el proceso de unión. Sin embargo, los

Capítulo 1

ensayos de unión *in vitro* con una variedad de líneas celulares establecen que la FHA es una adhesina importante, al menos en condiciones de laboratorio^{61,146}.

Una vez adherida a la superficie ciliada del epitelio respiratorio, *B. bronchiseptica* provoca parálisis ciliar y daño en el epitelio respiratorio. Esto provoca que las vías respiratorias no eliminen las secreciones mucosas y permanezca la bacteria en el tracto respiratorio. Las subespecies de *Bordetella* muestran una unión diferencial a las células ciliadas de diferentes huéspedes. Toumanen y colaboradores demostraron que *B. pertussis* se adhiere preferentemente a las células ciliadas del tracto respiratorio humano, mientras que *B. bronchiseptica* se adhiere preferentemente a las células ciliadas de conejos, ratones y hámsteres, lo que sugiere que la especificidad del huésped puede depender en parte de la interacción de las adhesinas bacterianas con los receptores del huésped¹⁴⁷.

Además de presentar tropismo por las células epiteliales ciliadas, *B. bronchiseptica* se adhiere a otros tipos celulares como los macrófagos alveolares, las células dendríticas y diferentes líneas de células epiteliales no ciliadas¹⁴⁸.

El daño tisular local de las células epiteliales ciliadas provocado por *B. bronchiseptica* se debe a la presencia de sus toxinas como TCT, Tdn, CyaA y SST3⁴.

El pulmón infectado presenta una inflamación generalizada, con un gran número de células infiltrativas con predominio de los granulocitos polimorfonucleares distribuidas en todo el pulmón. Las células inflamatorias que se infiltran en los pulmones durante la infección sufren apoptosis en ratones infectados con cepas de tipo salvaje, pero aquellos ratones infectados con una cepa mutante deficiente en el SST3 o CyaA dan como resultado una inflamación y una histopatología respiratoria significativamente menores^{47,114}, destacando la importancia de estos dos factores en la generación del foco inflamatorio. Estos dos factores no solo están implicados en causar inflamación sino también que interaccionan con componentes del sistema inmune para modular la respuesta adaptativa del huésped permitiendo la permanencia de la bacteria dentro del mismo.

Luego de este período agudo de la infección, *B. bronchiseptica*, es capaz de persistir dentro del huésped durante estadios crónicos y asintomáticos de infección posiblemente como consecuencia de su capacidad de formar *biofilm* en el tracto respiratorio y de invadir y sobrevivir en células epiteliales y fagocíticas^{149,150}.

Sobrevida intracelular

Las bacterias del género *Bordetella* son capaces de superar la respuesta del huésped y establecerse dentro del mismo por períodos prolongados de tiempo. Uno de los mecanismos moleculares que les permitiría a estas bacterias protegerse frente a distintos efectores inmunes y permanecer dentro del huésped es la capacidad de sobrevida intracelular. De hecho, se ha demostrado que son capaces de sobrevivir dentro de células epiteliales, dendríticas y macrófagos¹⁵⁰⁻¹⁵³. Los mecanismos que permitirían a estas bacterias sobrevivir dentro de las células inmunes difieren entre las especies de este género. Mientras que *B. pertussis* sería capaz de evitar la fusión fagolisosomal dentro de los macrófagos, *B. bronchiseptica* no sería capaz de hacerlo y permanecería dentro de la bacteria en un compartimento ácido¹⁵⁴.

Para poder sobrevivir dentro de las células, las bacterias tendrán que adaptarse al entorno desfavorable al que están sometidas. El pH letal, la falta de nutrientes y la generación de intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno son algunas de las amenazas a las que se enfrentarán las bacterias intracelulares al entrar en las células huésped, lo que a menudo provoca daños en la integridad de las proteínas y el ADN y la privación de nutrientes.

En *B. bronchiseptica*, se ha observado que la cepa silvestre y los mutantes que carecen del gen *bvgS*, que codifica para el componente sensor del sistema BvgAS, presentan una viabilidad similar en las células dendríticas durante más de 72 h después de la infección. Esto indica que la supervivencia intracelular puede ser independiente del sistema BvgAS o que participan genes que se transcriben activamente en la fase Bvg^{-155,156}. De hecho, la evaluación de la expresión de genes de *B. bronchiseptica* durante la supervivencia intracelular en macrófagos apoyó estas observaciones. Tras la captación por los macrófagos, *B. bronchiseptica* activa la expresión de genes implicados en la reparación de proteínas, reparación del ADN, respuesta al estrés oxidativo, homeostasis del pH, chaperonas y activación de vías metabólicas específicas.

En particular, varios genes expresados durante la supervivencia intracelular son similares a los expresados en respuesta a la exposición a un pH bajo (pH inferior a 4) después de una previa adaptación al ácido (pH 5,5)¹⁵⁷. Entre estos genes se pueden mencionar los que codifican para proteínas ribosómicas (proteína ribosómica L1, L4 y L5), chaperonas moleculares (GroEL, HSP 90 y DnaK), proteasas (BB3293 y BB1248) y proteínas del metabolismo relacionadas entre sí (succinato-semialdehído deshidrogenasa, aconitato hidratasa y arginina succinato sintasa).

Adicionalmente, los estudios de transcriptómica de macrófagos infectados muestran que, *B. bronchiseptica* inhibe la expresión de genes implicados en la virulencia bacteriana. Ninguno de los factores de virulencia conocidos, incluidos los sistemas de secreción SST3 y SST6, la toxina CyaA, las adhesinas PRN y FHA, y otros 205 genes de fase Bvg⁺, fueron encontrados transcripcionalmente activos en esta

condición^{158,159}. Recientemente se informó un patrón de expresión similar para *B. pertussis* dentro de los macrófagos, donde la expresión de genes que codifican factores de virulencia como el SST3, CyaA, PRN, Fim (Fim2) y la proteína de resistencia sérica BrkA, entre otros también se encontraban inhibidos en esta condición¹⁶⁰.

En la búsqueda de sistemas de dos componentes que pudieran estar implicados en la persistencia de *B. bronchiseptica* dentro de los macrófagos, además del sistema BvgAS, Jungnitz y su grupo de trabajo identificaron y describieron al sistema RisAS previamente mencionado. Una mutación por transposón en este operón produjo una menor sobrevivencia de *B. bronchiseptica* en los macrófagos y una menor capacidad de la bacteria de colonizar el tracto respiratorio de ratones¹³⁸. Además, el mutante es incapaz de resistir a la acidificación fagolisosomal y a la presencia de especies reactivas de oxígeno¹⁶¹. Como se mencionó anteriormente, RisA puede activar la expresión de los genes *vrgs* y regula además otros genes diferentes a los *vrgs* que podrían estar también implicados en la sobrevivencia intracelular.

Más allá de los avances aquí reseñados, los mecanismos que le permiten a *B. bronchiseptica* persistir dentro de las células eucariotas siguen sin comprenderse en su totalidad. Probablemente existan mecanismos aún no descritos que permitan este comportamiento.

Formación de *biofilm* en *B. bronchiseptica*

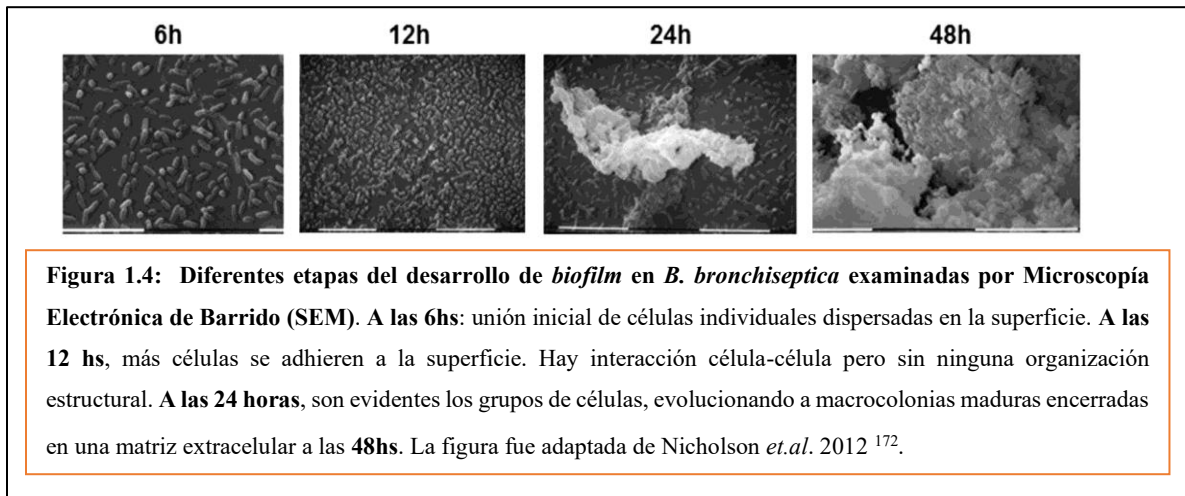
Otro mecanismo que permitiría a *B. bronchiseptica* infectar, evadir mecanismos de la respuesta inmune y persistir por largos períodos de tiempo en el huésped es su capacidad de formar *biofilm*.

Una de las definiciones de *biofilm* con más aceptación en la actualidad establece que es una comunidad microbiana sésil, caracterizada por células adheridas a un sustrato o interfase, o unas con otras, las cuales están contenidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares producidas por ellas mismas y que expresan un fenotipo propio¹⁶². El desarrollo de un *biofilm* microbiano tiene lugar mediante una serie de etapas: 1) adhesión de células a una superficie biótica o abiótica; 2) crecimiento y agregación de células formando microcolonias; 3) maduración y mantenimiento de la estructura del *biofilm*; 4) desprendimiento de células de la estructura para colonizar otros ambientes. Estas etapas, en general, se encuentran conservadas en un amplio rango de microorganismos. Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la formación de *biofilms* pueden diferir de un organismo a otro.

Varios trabajos realizados durante los últimos años por distintos grupos de investigación han demostrado que tanto *B. bronchiseptica* como *B. pertussis* son capaces de formar *biofilm* sobre superficies abióticas, como vidrio, polipropileno, poliestireno, y sobre superficies bióticas como la cavidad nasofaríngea y la tráquea de ratón^{146,163-165}. Se han visualizado *biofilms* en el tracto respiratorio de animales

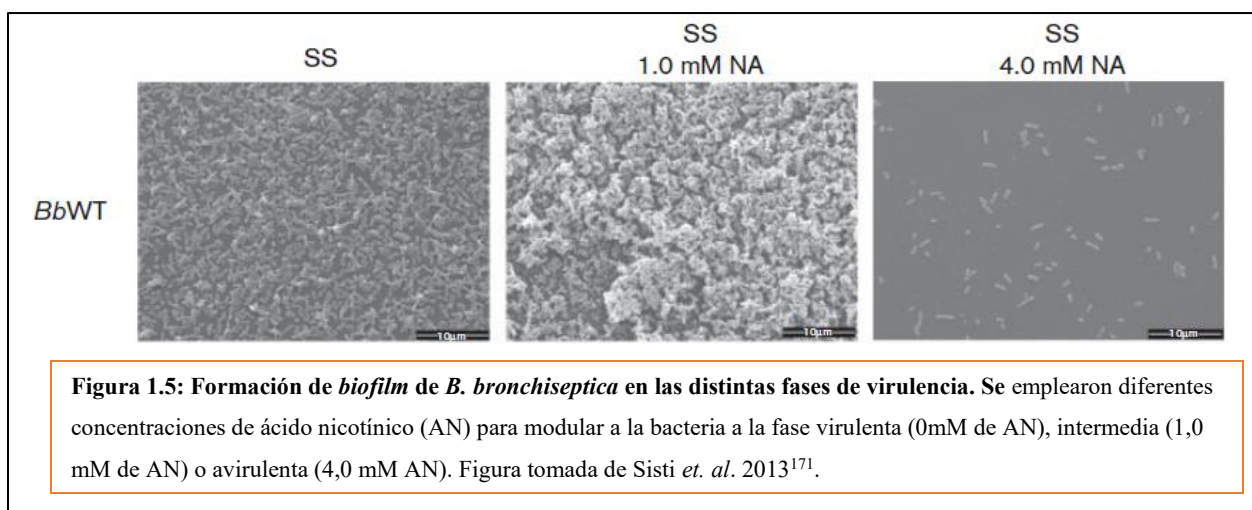
infectados con *B. bronchiseptica* hasta 38 días post-inoculación, y de 19 días en *B. pertussis*, lo que sugiere que la formación de *biofilms* permite la persistencia bacteriana en el tracto respiratorio^{146,166}.

Así como en otras bacterias, la formación de *biofilm* en *B. bronchiseptica* puede ser visualizada microscópicamente como un proceso secuencial con características distintivas en cada una de las etapas. El proceso inicia con la unión de las células bacterianas a la superficie, seguido por la formación de una monocapa que cubre casi toda la superficie (Figura 1.4). En esta etapa, los *biofilms* de *Bordetella* no muestran atributos estructurales tridimensionales. En estadios posteriores, los *biofilms* se caracterizan por *clusters* de células separados por células individuales, seguido de la formación de macrocolonias maduras encerradas en una matriz opaca compuesta por una o más macromoléculas, como ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos (Figura 1.4). En el caso de *biofilms* formados en sistemas de flujo continuo también se pueden observar estructuras de apoyo (*pillar-like structures*), canales de agua y/o microcolonias de forma irregular. Estos pilares de bacterias rodeados por canales de agua, al igual que en otras bacterias, se cree que les permite a las bacterias del *biofilm* acceder a los nutrientes y ayudar en la difusión de productos de desecho del metabolismo fuera del *biofilm*^{146,165-168}.



Dada la complejidad del proceso de formación de *biofilm* no es sorprendente que participen numerosas proteínas en las distintas etapas, y que estén involucrados varios sistemas de regulación. Sin embargo, a diferencia de otras bacterias en las que la regulación de la formación de *biofilm* está muy estudiada, como *Escherichia coli* o *Pseudomonas aeruginosa*, son pocos los factores descritos hasta el momento que regulan la formación de *biofilm* de *Bordetella spp.*

Los primeros estudios de *biofilm* en *Bordetella* estuvieron focalizados en analizar el rol del sistema BvgAS en la regulación de este fenotipo. Estos estudios, e incluso los realizados en nuestro laboratorio, documentan que, en condiciones del crecimiento estático, en presencia de concentraciones intermedias de ácido nicotínico que modulan a la bacteria a una fase de virulencia intermedia (Bvgⁱ) dan como resultado las mejores condiciones para promover la formación de *biofilm*. Mientras que, en la fase avirulenta (Bvg⁻) se obtiene la menor formación de *biofilm* (figura 1.5)¹⁶⁹⁻¹⁷¹.



Sin embargo, el rol del sistema de BvgAS puede ser diferente en distintas etapas del proceso de formación de *biofilm*. Nicholson y colaboradores revelaron que muchos de los genes activados por BvgAS se reprimen durante las primeras 6 horas, mientras que genes reprimidos por este sistema están expresados durante esta etapa. Específicamente, los genes implicados en la movilidad (*cheW*, *fliA*, *flgB*, *flaA*) están regulados positivamente, mientras que *bvgR* y los genes regulados positivamente por BvgAS (*bopD*, *fimA*, *cyaA*, *fimD*, *fimB*, *fimC*, *fhaC*, *fhaB*, *fim3*, *bvgS*, *befA* y *fim2*) están inhibidos. Con lo cual, *B. bronchiseptica* expresaría el flagelo durante el desarrollo temprano del *biofilm* y posteriormente lo reprimiría. Adicionalmente, los mismos autores mostraron que las cepas de *B. bronchiseptica* incapaces de producir el flagelo no lograron unirse a una superficie en las primeras etapas de formación de *biofilm*. Sin embargo, este defecto inicial se vio superado con el tiempo, ya que las cepas que carecen de producción de flagelo pudieron formar *biofilm* maduros de manera similar a la cepa silvestre en las últimas etapas de la formación del *biofilm*¹⁷².

En etapas avanzadas del proceso de formación de *biofilm* hay un aumento de la expresión de genes regulados positivamente por el sistema de BvgAS. Entre los componentes regulados por este sistema se ha descrito la participación de FHA y fimbria, dos adhesinas que se expresan tanto en fase virulenta como intermedia. Las mutaciones en *fim* afectan la formación de *biofilm* principalmente en fase virulenta mientras que FHA es clave en la formación de *biofilm* en fase intermedia promoviendo las interacciones bacteria-

sustrato y bacteria-bacteria^{170,146}. CyaA también participa en la formación de *biofilm* pero de una manera negativa. Hoffman y colaboradores demostraron que CyaA actúa interaccionando con FHA y bloqueando las interacciones bacteria-sustrato y bacteria-bacteria en las que FHA está comprometida. Dado que *cyxA* se deja de expresar en fase intermedia mientras que FHA se sigue expresando, el rol de FHA cobra más relevancia en la formación de *biofilm* en fase intermedia¹⁷³.

Nishikawa y colaboradores describieron otra adhesina, la proteína BrtA, que es importante para la formación de *biofilm* en la fase avirulenta ya que esta adhesina está regulada negativamente por el sistema BvgAS¹⁷⁴. Nuestro grupo de trabajo confirmó la importancia de esta adhesina en la formación de *biofilm* y amplió el conocimiento acerca del mecanismo de regulación de la localización de BrtA en la superficie celular. En este mecanismo participan la proteasa periplasmática LapG y la proteína transmembrana LapD. Cuando la proteasa LapG se encuentra libre en el espacio periplasmático cliva a BrtA y la libera de la membrana. Sin embargo, LapD es capaz de interaccionar y secuestrar a LapG para evitar que clive a BrtA de una manera dependiente de un segundo mensajero, el c-di-GMP. En presencia de este segundo mensajero, LapD une a c-di-GMP, secuestra a LapG y evita que BrtA sea clivada. De esta manera, BrtA permanece anclada a la membrana y contribuye a la formación del *biofilm*. Mientras que, en ausencia de c-di-GMP, LapG es liberada al espacio periplasmático y cliva a BrtA disminuyendo de esta manera la formación de *biofilm*¹⁷⁵.

Como se ha encontrado para otros organismos formadores de *biofilm*, otro componente importante en la estructuración y maduración del *biofilm* de *Bordetella spp.* es la matriz extracelular. En *Bordetella* esta matriz contiene polisacáridos, LPS, ADN extracelular y proteínas. El ADN extracelular es importante tanto para las etapas iniciales de formación de *biofilm* como para mantener la estructura de los *biofilm* maduros *in vitro* (en cultivos estáticos) e *in vivo* (en el tracto respiratorio del ratón)¹⁷⁶.

Por otro lado, el contenido de azúcar de la matriz del *biofilm* de *B. bronchiseptica* está compuesto por xilosa y poli- β -1-6-N-acetil-D-glucosamina (PNAG)^{168,177,178}.

El PNAG originalmente se llamaba Bsp (del inglés *Bordetella polysaccharide*) pero recientemente se volvió a anotar como *pga* por la similitud del operón *pgaABCD* de *Bordetella*, con el locus *pga* de otras bacterias Gram negativas como por ejemplo el *pga* de *E. coli* o el locus *ica* de *Staphylococcus*^{167,179}. Este locus codifica para los productos implicados en la producción, modificación y exportación de este polisacárido. PNAG no solo es esencial para el desarrollo de *biofilm in vitro*, sino también para la colonización persistente del tracto respiratorio por *B. bronchiseptica* y para la colonización temprana de la nariz y la tráquea por *B. pertussis*^{164,165}.

Capítulo 1

Su producción es iniciada por el complejo PgaC y PgaD que sintetizan y transportan PNAG a través de la membrana citoplasmática. Seguidamente, PgaA y PgaB lo unen y lo translocan a través del espacio periplásmico^{180,181,182-186}.

La regulación de la expresión del locus *pgaA-D* en *B. bronchiseptica* se encontró que no está regulada por BvgAS¹⁶⁶ pero sí se encuentra regulado negativamente por el factor transcripcional BpsR, que es homólogo a la familia de reguladores transcripcionales del tipo MarR^{187,188,166}.

Adicionalmente, se ha descrito otro factor implicado en la regulación de la formación de *biofilm* en *Bordetella*, el segundo mensajero (p)ppGpp. Esta molécula es una alarmona implicada en la regulación de respuestas a diversos estreses, en el crecimiento celular y la virulencia en una variedad de bacterias¹⁸⁹. El rol de este segundo mensajero ha sido determinado en *B. pertussis*, pero no en *B. bronchiseptica*. En *B. pertussis* la síntesis y la degradación de este segundo mensajero esta mediada por las proteínas RelA y SpoT. RelA es capaz de sintetizar (p)ppGpp, mientras que SpoT es bifuncional, sintetiza y degrada (p)ppGpp. La delección de estas dos enzimas en *B. pertussis* generó defectos en la formación de *biofilm* redujo la viabilidad de la bacteria en condiciones de limitación de nutrientes y generó una mayor la susceptibilidad al estrés oxidativo¹⁹⁰.

Por último, como se describirá en el próximo apartado, nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en estudiar el rol del segundo mensajero c-di-GMP en la formación de *biofilm* en *B. bronchiseptica*. Así como en otras bacterias, la presencia de c-di-GMP favorece la formación de *biofilm* en esta bacteria. Como se describió anteriormente, uno de los mecanismos por los cuales podría estar el c-di-GMP involucrado es a través de la unión de c-di-GMP a la proteína LapD favoreciendo de esta manera la localización de BrtA en la membrana de la bacteria. Sin embargo, en ausencia de la adhesina BrtA, la formación de *biofilm* sigue siendo mayor cuando aumentan los niveles de c-di-GMP indicando que otros mecanismos dependientes de c-di-GMP aún desconocidos están implicados en la regulación de este fenotipo^{171,175}.

Sistema de señalización por c-di-GMP

Como se describió anteriormente, las bacterias del género de *Bordetella* emplean diversos factores de virulencia y mecanismos de patogénesis para poder colonizar, evadir la respuesta inmune y permanecer dentro del tracto respiratorio de diversos mamíferos. De qué manera logran hacerlo sigue quedando aun por comprender en su totalidad. Numerosos trabajos se han focalizado en estudiar la regulación de todos estos procesos mediante el sistema de dos componentes BvgAS. Sin embargo, existe evidencia clara que muestra que en el control de estos procesos intervendrían otros sistemas de regulación en respuesta las diversas señales del entorno a la que está sometida la bacteria. En nuestro grupo de trabajo nos enfocamos en estudiar el sistema de regulación mediado por c-di-GMP, el cual se describirá a continuación.

El c-di-GMP o diguanilato cíclico fue descrito por primera vez en el año 1987 por Benziman y colaboradores como “un inusual nucleótido cíclico” capaz de activar la celulosa sintasa de la Alpha proteobacteria *Acetobacter xylinum* (también conocida como *Gluconacetobacter xylinus*, y más recientemente nombrada como *Komagataeibacter xylinus*)¹⁹¹.

El reconocido trabajo de estos autores, publicado en la revista *Nature*, significó el final de la búsqueda del activador de bajo peso molecular de la celulosa sintasa *in vitro*, y al mismo tiempo, marcó el comienzo de una nueva área de investigación del rol de este segundo mensajero en los procesos celulares.

Actualmente, el c-di-GMP se considera un segundo mensajero casi ubicuo en bacterias, implicado en la regulación de diversos procesos bacterianos como es la transición entre diferentes estilos de vida: promueve el estilo de vida sésil o de formación de *biofilm* mientras que inhibe la movilidad en las bacterias¹⁹². Para esto, el c-di-GMP estimula la biosíntesis de adhesinas y diversos componentes de la matriz extracelular a la vez que inhibe diversas formas de movilidad¹⁹³. Además, el c-di-GMP controla la progresión del ciclo celular, la supervivencia a largo plazo y la respuesta a diversos estreses ambientales, la producción de antibióticos e incluso, regula mecanismos implicados en la virulencia de determinados patógenos como son la adherencia e invasión de células huésped, citotoxicidad, infección intracelular, secreción de factores de virulencia, resistencia al estrés oxidativo y modulación de las respuestas inmunitarias¹⁹³⁻¹⁹⁵.

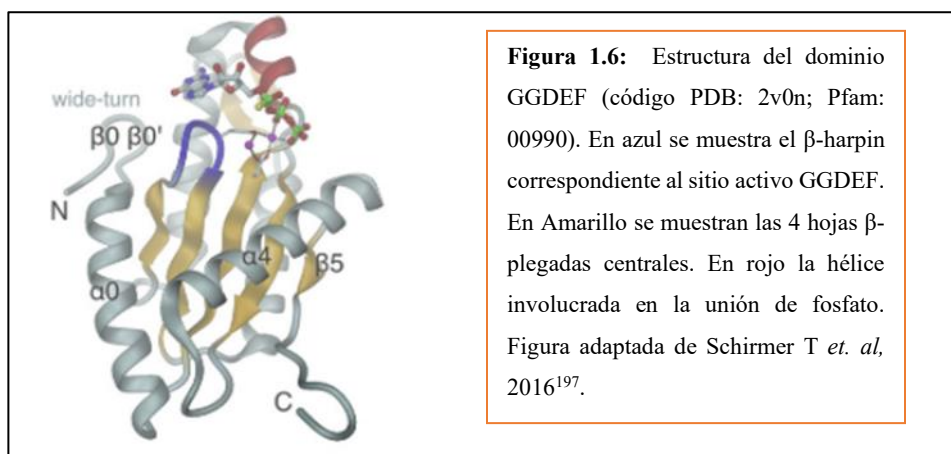
Este segundo mensajero se sintetiza a partir de dos moléculas de GTP gracias a la acción de diguanilato ciclasas y se hidroliza a 5'-fosfoguanilil-(3'-5')-guanosina (pGpG) o GMP por acción de fosfodiesterasas específicas^{194,196}. La actividad diguanilato ciclasa está asociada con el dominio GGDEF, el cual recibe este nombre por los aminoácidos conservados en su sitio activo: GG [D/E]EF. Por otro lado, la actividad específica fosfodiesterasa está asociada a dominios EAL o HD-GYP, que también reciben estos nombres por los aminoácidos conservados del sitio activo. Por lo tanto, los niveles intracelulares de este segundo mensajero se encuentran controlados por la actividad enzimática antagonista de diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas.

La secuenciación a gran escala de los genomas bacterianos ha añadido una pieza interesante, ya que ha permitido conocer que el número de proteínas bacterianas con dominios GGDEF, EAL y HD-GYP codificadas en los genomas es muy variable. Unas pocas especies no tienen ninguna (por ejemplo, *Helicobacter pylori*), la mayoría presentan un número intermedio (por ejemplo, *E. coli* que cuenta con 19 proteínas con dominios GGDEF y 17 con dominios EAL) y otras como *Vibrio vulnificus* codifican hasta 100 de estas proteínas. Esta gran cantidad de genes presentes en un dado genoma parece ser una redundancia, sin embargo, como se describirá más adelante, tanto las diguanilato ciclasas como las fosfodiesterasas son capaces de responder a distintas señales ambientales y regular la producción del c-di-GMP permitiendo que éste pueda actuar a nivel transcripcional, postranscripcional y/o postraduccional regulando diversos procesos celulares específicos.

Diguanilato ciclasas

Las diguanilato ciclasas sintetizan el c-di-GMP a través de sus dominios GGDEF, a partir de dos moléculas de GTP y la coordinación de cationes Mg^{+2} o Mn^{+2} para su función. Estos dominios GGDEF presentan un plegado tipo: $\beta 1\alpha 1\alpha 2\beta 2\beta 3\alpha 3\beta 4$ con dos hojas β antiparalelas centrales conectadas por un β -harpin portando el motivo GGD[D/E]F correspondiente a los aminoácidos del sitio activo (Figura 1.6).

Los dos primeros residuos de este motivo (G) están implicados en la unión a GTP. El aspartato (D), que a veces es glutamato (E) junto con otro aspartato (D) conservado del $\beta 1$ están, en ambos casos, coordinando los dos iones metálicos críticos para la catálisis¹⁹⁷.



Se ha podido conocer que un requisito clave y un paso regulado en la catálisis del c-di-GMP es la dimerización de los dominios GGDEF. Esto permite que se produzca el acercamiento de las dos moléculas de GTP unidas a cada uno de los monómeros y se produzca un ataque nucleofílico intermolecular del grupo 3'-hidroxilo de una molécula de GTP sobre los átomos de fósforo de la molécula de GTP adyacente dando lugar a la formación de una molécula de c-di-GMP y la liberación de dos moléculas de pirofosfato (PP)¹⁹⁷.

Sin embargo, estos dominios GGDEF son incapaces de dimerizar por si solos y presentan muy poca o nula actividad cuando se realizan ensayos de actividad *in vitro* e *in vivo*. En general, la capacidad de dimerizar y el estado catalíticamente activo de estas enzimas viene dado por los dominios accesorios al dominio GGDEF que se encuentran sobre sus regiones N-terminales, y se conectan a estos a través de un segmento helicoidal o motivo *coiled coil* rico en leucinas¹⁹⁷.

Estos dominios N-terminales, son dominios regulatorios o de sensado de la señal, capaces de responder a diferentes señales intra o extracelulares. Entre estos se pueden mencionar: los dominios REC, PAS, GAF, GLOBIN, etc. Las proteínas de señalización que combinan los dominios GGDEF con los dominios REC son reguladores de respuesta de los sistemas de traducción de señales de dos componentes. Estos reguladores de respuesta se fosforilan o no en respuesta a las señales extracelulares o intracelulares recibidas por su sensor afin. Entre las señales que detectan los dominios PAS, por ejemplo, se encuentra el oxígeno, la luz, el voltaje, el potencial redox y los hidrocarburos aromáticos. Los dominios GAF, tienen una estructura similar a los dominios PAS y se caracterizan por tener una estructura de bolsillo que pueden albergar pequeñas moléculas como el GMPc o AMPc, mientras que en el caso de los dominios GLOBIN sensan oxígeno^{193,196,198,199}.

Mecanismos de activación e inhibición

El estado catalíticamente activo de estas enzimas está determinado por los rearrreglos conformacionales que se produzcan dentro del dímero de manera tal que las moléculas de GTP unidas en cada uno de los monómeros queden enfrentadas para que se produzca la reacción. Hasta la fecha se han dilucidado dos mecanismos de activación. En el caso de las enzimas que poseen los dominios REC, se debe producir la fosforilación para que luego se produzca la dimerización y el estado competentemente activo. Por otro lado, las enzimas que presentan dominios GLOBIN, PAS, GAF y HAMP parecen ser dímeros o tetrámeros constitutivos, pero necesitan la señal para ser activadas. Cuando sensan la señal se producen rearrreglos en el dímero para pasar del estado inactivo al estado catalíticamente activo¹⁹⁷.

En cuanto a los mecanismos de inactivación de estas enzimas, se conoce que la mayoría de los dominios GGDEF presentan cerca de su sitio activo, a unos cinco aminoácidos de distancia, un sitio de inhibición o sitio I. Este sitio está compuesto por el motivo RxxD, donde x es cualquier aminoácido y establece un modo de inhibición de tipo *feedback* negativo: cuando dos moléculas de c-di-GMP intercaladas interaccionan con la arginina y el aspartato de este sitio se genera un aumento en la rigidez en la proteína y secuestra el sitio catalítico del dímero, impidiendo así la catálisis. Este mecanismo evita el consumo excesivo de GTP y controla la cantidad de c-di-GMP disponible¹⁹³.

Otro mecanismo de activación/ inhibición que se ha sido dilucidado es el de la diguanilato ciclasa DgcZ dependiente de Zinc de *E. coli*. Esta enzima presenta un dominio catalítico GGDEF fusionado a un

dominio CZB (dominio de unión a zinc). DgcZ es un dímero constituido y su actividad es alostéricamente controlada por el dominio CZB. En presencia de Zinc, los dominios GGDEF del dímero DgcZ no están posicionados en una conformación catalíticamente competente, con lo cual la enzima no es capaz de sintetizar c-di-GMP. Mientras que, en ausencia de Zinc, DgcZ puede ser activada a través del reposicionamiento de los dominios GGDEF²⁰⁰.

Fosfodiesterasas

La actividad fosfodiesterasa de las enzimas que degradan c-di-GMP está asociada a los dominios EAL y HD-GYP, dos familias de dominios no relacionadas. Las fosfodiesterasas de tipo EAL hidrolizan c-di-GMP en presencia de Mg^{+2} o Mn^{+2} para producir pGpG y son fuertemente inhibida por Ca^{+2} y Zn^{+2} . Mientras que, las fosfodiesterasas que presentan dominios HD-GYP hidrolizan el c-di-GMP en dos moléculas de GMP en una reacción de un solo paso²⁰¹.

Los dominios EAL, al igual que los dominios GGDEF suelen estar asociados a dominios sensoriales o regulatorios que modulan la actividad fosfodiesterasa. A diferencia de los dominios GGDEF que deben funcionar como dímeros, los dominios EAL parecen tener actividad como monómeros. Sin embargo, la vasta mayoría de los dominios EAL caracterizados hasta la fecha forman dímeros u oligómeros de mayor orden *in vitro*. El estado del dímero parece ser crítico para la activación de las fosfodiesterasas por estímulos ambientales. Por lo tanto, el dímero es la unidad más probablemente comprometida en la hidrólisis de c-di-GMP *in vivo*²⁰².

El dominio HD-GYP es un subconjunto de la familia HD más grande, cuyos miembros poseen actividades hidrolíticas hacia diversos sustratos^{203,204}. Los primeros en identificar a los dominios HD-GYP como un dominio involucrado en la degradación de c-di-GMP fueron Ryan y colaboradores quienes utilizaron la proteína RpfG con dominio HD-GYP de *Xanthomonas campestris* (XC_2335) para probar esta hipótesis. La expresión heteróloga de RpfG reemplazó funcionalmente una fosfodiesterasa con dominio EAL y mediante análisis *in vitro* con la proteína RpfG purificada demostraron que tenía actividad fosfodiesterasa específica de c-di-GMP²⁰⁵.

Proteínas con dominios GGDEF y EAL o HD-GYP

Análisis genómicos demuestran que existen proteínas “duales”, las cuales presentan dominios GGDEF y EAL o HD-GYP formando parte de una misma proteína. De hecho, las primeras diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas descritas de *K. xylinus* contenían dominios GGDEF y EAL organizados en tándem²⁰⁶. La existencia de este tipo de proteínas podría explicarse considerando que ambos dominios están regulados diferencialmente, ya sea por señales ambientales o intracelulares. De esta forma, a pesar de ser ambos dominios enzimáticamente activos, una de las actividades prevalece sobre la otra en un momento

dado. Un ejemplo es la proteína BphG1, una proteína fotosensible de *Rhodobacter sphaeroides* que tiene actividad fosfodiesterasa pero que al ser sobreexpresada en *E. coli* sufre proteólisis sitio-específica, dando como resultado un fragmento con actividad diguanilato ciclasa²⁰⁷. Otra posibilidad, que es la que se encuentra con mayor frecuencia en este tipo de proteínas, es que uno de los dos dominios sea inactivo. Este tipo de dominios degenerados pueden cumplir otras funciones, como son funciones regulatorias, estructurales o estar participando de interacciones proteína-proteína^{208,209}.

Receptores de c-di-GMP

Aunque el control coordinado de la síntesis y degradación de c-di-GMP explica cómo son controlados los niveles celulares de este segundo mensajero, el efecto final de su regulación dependerá del receptor respectivo al que se una y de los componentes celulares regulados por el mismo.

Actualmente se han identificado cuatro familias de receptores de c-di-GMP con una caracterización estructural y funcional bien conocida. Estos receptores son las proteínas que contienen dominios PilZ^{210,211}, proteínas que contienen dominios GGDEF o EAL degenerado²¹², factores transcripcionales²¹³ y receptores basados en ARN: los *riboswitches*^{214,215}.

Los primeros receptores en ser descritos fueron los dominios PilZ los cuales unen c-di-GMP a través de los motivos RxxxR y DxSxxG²¹⁶. La unión de c-di-GMP a estos dominios presentes en determinadas proteínas puede provocar la activación de esta y permitir que funcione a través de interacciones proteína-proteína. Por ejemplo, Morgan y colaboradores observaron que la activación de la celulosa sintasa BcsA-BcsB de *K. xylinus* se produce a través de la unión del c-di-GMP al dominio PilZ de BcsA favoreciendo de esta manera la producción del exopolisacárido^{192,217}. También, los dominios PilZ regulan la movilidad en varias especies bacterianas como en *Caulobacter crescentus*²¹⁸ y *P. aeruginosa*²¹⁹, además de regular la virulencia en *Vibrio cholerae*²²⁰.

El segundo tipo de receptores son las proteínas que contienen dominios GGDEF y EAL degenerados, es decir, que carecen de los aminoácidos GGDEF y EAL esenciales para su actividad diguanilato ciclasa y fosfodiesterasa respectivamente²²¹. Aunque estas proteínas no pueden participar en la síntesis o degradación de c-di-GMP, pueden funcionar como receptores de c-di-GMP al unirse a GTP o c-di-GMP para modular alostéricamente la actividad de una proteína o dominio asociado. Por ejemplo, la unión de GTP a la proteína PdeA de *C. crescentus* que contiene el dominio GGDEF degenerado puede afectar la actividad del dominio EAL C-terminal, regulando indirectamente el nivel celular de c-di-GMP²²². Las proteínas que contienen el dominio GGDEF degenerado, pero aún conservan su sitio I intacto, también puede funcionar como efectores a través de la unión del c-di-GMP a este sitio. Un ejemplo destacado es la proteína PelD de *P. aeruginosa* que contiene un dominio GGDEF degenerado, pero utiliza un sitio I intacto para unirse a c-di-GMP y regular la formación de *biofilm* en esta bacteria²²³. Simultáneamente al

descubrimiento de diguanilato ciclasas degeneradas que pueden actuar como efectores, Newell y colaboradores identificaron una proteína que contiene un dominio EAL degenerado, LapD, como un receptor c-di-GMP. Dado que el primer paso que debe dar una fosfodiesterasa es unirse a c-di-GMP, quizás no sea sorprendente que un dominio EAL degenerado pueda participar en la unión de c-di-GMP. Desde entonces, LapD de *P. fluorescens* se ha convertido en el ejemplo prototipo de una proteína degenerada que contiene un dominio dual GGDEF/EAL que puede unirse a c-di-GMP a través de su dominio EAL degenerado^{224,225}.

El tercer tipo de receptor de c-di-GMP es una familia de factores de transcripción, como proteínas sensibles a AMPc y miembros de reguladores de respuesta, que pueden unirse a c-di-GMP a través de interacciones ligando-efector^{226,227}. Un ejemplo típico de este tipo de receptores son las proteínas con dominios ATPasas. Por ejemplo, FleQ de *P. aeruginosa* presenta un dominio REC N-terminal, un dominio ATPasa AAA+ y un dominio de unión al ADN C-terminal²²⁷. Los estudios estructurales indicaron que el dominio ATPasa AAA+ puede unir c-di-GMP en un sitio distinto al sitio de unión de ATP e inhibir la actividad enzimática ATPasa¹⁹². Ciertos homólogos de FleQ también pueden actuar como efectores de c-di-GMP. Por ejemplo, MshE, una AAA+ ATPasa en *V. cholerae*,²²⁸ y el factor de transcripción VpsT también de *V. cholerae* que es capaz de unirse a c-di-GMP a través de un motivo W[F/L/M][T/S]R, lo que da como resultado un cambio en la oligomerización que permite que este factor de transcripción regular la formación de *biofilm* y la movilidad²²⁹.

Finalmente, el c-di-GMP es un ligando para un receptor basado en ARN, el *riboswitch*. En términos generales los *riboswitches* son secuencias de ARN no codificantes localizadas en el extremo 5' del ARNm que adopta estructuras secundarias específicas y une pequeñas moléculas de ligandos²³⁰. Tras la unión del ligando, cambia la estructura secundaria, lo que resulta en un cambio en la transcripción, la estabilidad de ARNm o la traducción de los genes *downstream*.

Algunos ejemplos de bacterias que presentan este tipo de regulación génica son *Clostridium difficile* y *Geobacter uraniumreducens*²³¹. Sin embargo, este tipo de receptores no ha sido tan estudiado como los anteriores.

Mecanismos de regulación

La acción de las diversas enzimas antagónicas no se suma y converge para determinar el nivel global de c-di-GMP celular. En cambio, este sistema de señalización es aún más complejo e implica mecanismos de señalización “locales” y “globales” de c-di-GMP que permiten dar respuestas específicas y coordinadas frente a diferentes entornos y/o señales.

En cuanto a los mecanismos de señalización locales de c-di-GMP, varios trabajos han demostrado que existen interacciones directas proteína-proteína entre diguanilato ciclasas, fosfodiesterasas y sus

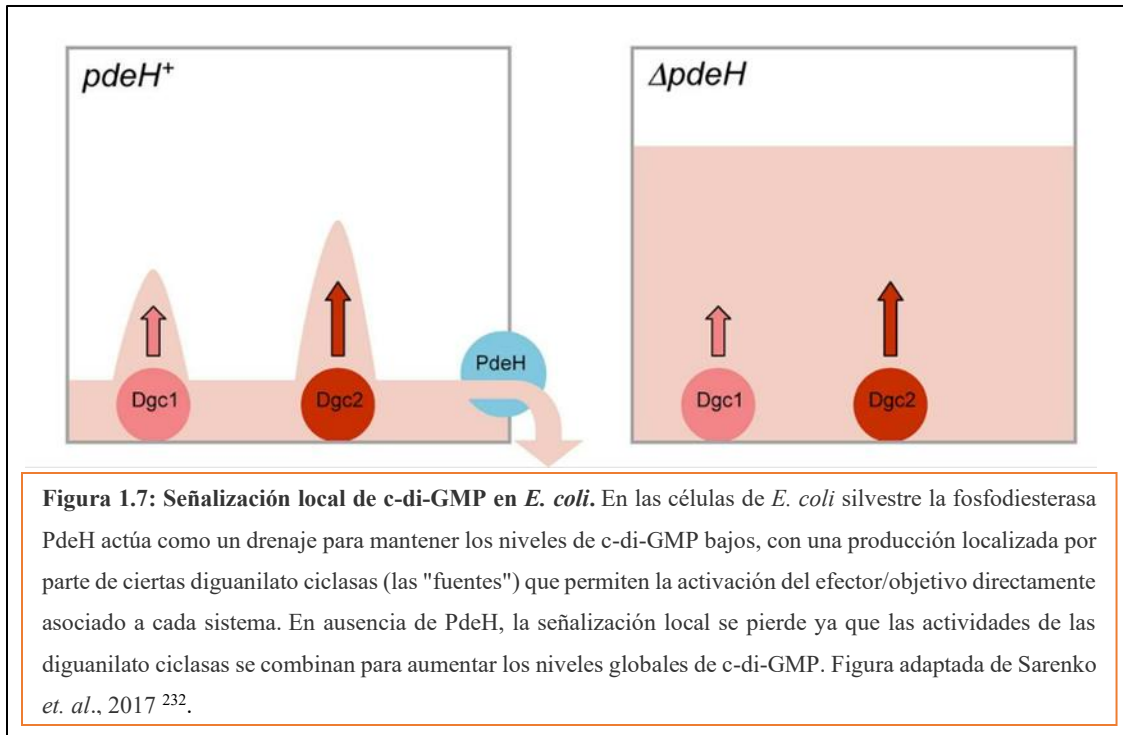
sistemas efectores específicos. Si bien una diguanilato ciclasa y una fosfodiesterasa pueden cooperar como un par específico al asociarse con un efector particular, generalmente no vienen en pares afines. Más bien, algunas parecen actuar solas, mientras que en otros casos más de un par pueden unirse a conjuntos de proteínas más grandes o supermódulos^{232,233}. Estas interacciones pueden acercar a los actores moleculares entre sí, de modo que las diguanilato ciclasas y las fosfodiesterasas involucradas pueden actuar como una fuente local y un sumidero para c-di-GMP, respectivamente, justo al lado del sistema efector. Un ejemplo bien estudiado es el control del complejo de celulosa sintasa BcsA/BcsB de *E. coli*^{217,234}. Aquí, la síntesis y la transferencia de celulosa al periplasma depende de la unión de c-di-GMP al dominio PilZ de la glucosiltransferasa BcsA^{217,235}. El c-di-GMP es suministrado específicamente por la diguanilato ciclasa DgcC que se acopla, junto a la fosfodiesterasa PdeK, a la subunidad BcsB para activar la biosíntesis de celulosa *in vivo*. Las mutaciones puntuales en los motivos GGDEF y EAL de DgcC y PdeK, respectivamente, dan como resultado fenotipos nulos, es decir, que su función única pero crucial parece proporcionar y degradar c-di-GMP justo al lado del complejo Bcs²³⁶.

En contraste, las interacciones de estas proteínas sobre sus efectores también puede tener efectos regulatorios tal como ha sido descrito para la fosfodiesterasa PdeR de *E. coli*. PdeR se une e inhibe tanto a la diguanilato ciclasa DgcM como al factor transcripcional MlrA^{237,238}. Sin embargo, cuando PdeR se une y degrada c-di-GMP, que es proporcionado específicamente por DgcE, se liberan DgcM y MlrA. Como consecuencia, DgcM ahora también puede producir c-di-GMP (que proporciona una retroalimentación positiva en este circuito) y el complejo DgcM-MlrA activa el inicio de la transcripción en el promotor *csgD*, es decir, impulsa la expresión del regulador requerido para producir la matriz de *biofilm* que consta de fibras curli y pEtN-celulosa. Por lo tanto, aunque PdeR es una fosfodiesterasa, esta función enzimática es una actividad secundaria que le permite operar como un efector sensible a c-di-GMP en este sistema²³¹.

La especificidad de las diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas con sus efectores también estaría regulada por los niveles globales de c-di-GMP. Según los estudios realizados por Hengge en *E. coli*, los niveles globales de c-di-GMP se mantendrían bajos, sustancialmente más bajo que el Kd del efector para la unión de c-di-GMP. De esta manera solo el aumento local establecido por la/s diguanilato ciclasas a fines pueden producir un cambio sobre la vecindad de su efector. Esta hipótesis es avalada por la observación de fenotipos específicos provocados por la desactivación de una diguanilato ciclasa o fosfodiesterasa en particular en ausencia de cambios concomitantes en los niveles celulares de c-di-GMP²³⁶.

En *E. coli*, el nivel extremadamente bajo de c-di-GMP celular se establece mediante una fosfodiesterasa "maestra" citosólica fuertemente expresada, PdeH (Figura 1.7). PdeH elimina de manera eficiente las contribuciones globales de muchas diguanilato ciclasas, que se expresan y activan al mismo tiempo, lo que permite y restringe que estas enzimas activen localmente su sistema efector específico. En ausencia de la fosfodiesterasa maestra, el nivel celular de c-di-GMP es mucho mayor y puede activar estos

sistemas globalmente, es decir, que las diguanilato ciclasas contribuyen de manera redundante a los niveles de c-di-GMP globales²³².



Mecanismos de regulación de c-di-GMP en *B. bronchiseptica*

Dentro de los genomas de las *Bordetellas* clásicas, se pueden identificar, mediante análisis bioinformáticos, la presencia de numerosos genes que codifican para posibles diguanilato ciclasas o fosfodiesterasas. En el genoma de *B. bronchiseptica*, se encuentran presentes diez genes que codifican para proteínas con dominios GGDEF, cinco genes que codifican para proteínas con dominios EAL, dos para proteínas con dominios HD-GYP y cuatro genes que codifican para proteínas duales con dominios GGDEF-EAL.

En el año 2013 nuestro grupo de investigación se inició en la descripción del rol del c-di-GMP en la biología de esta bacteria. Mediante el empleo de una cepa que sobreexpresa una diguanilato ciclasa activa propia de *B. bronchiseptica* (BB3576) demostraron que altos niveles de c-di-GMP conducen a una mayor formación de *biofilm* mientras que disminuyen la movilidad respecto de la cepa parental. La diguanilato ciclasa BB3576 empleada para estos ensayos fue renombrada BdcA (por *Bordetella diguanylate cyclase A*). Estudios posteriores, mostraron que una mutación en el sitio activo GGDEF de BdcA por GGAAF no condujo al aumento en la formación de *biofilm* característico de la sobreexpresión de *bdcA*, y la delección de *bdcA* no afectó los niveles de *biofilm* formados por *B. bronchiseptica*²³⁹. A su vez, se demostró que la inhibición de la movilidad debido a la sobreexpresión de BdcA podría deberse a cambios en la expresión

de la flagelina, ya que esta cepa presentó una disminución en la síntesis de flagelina incluso en una cepa bloqueada en fase avirulenta^{171,239}.

En la búsqueda de efectores sobre los que BdcA pueda actuar, hallamos que en ausencia de la proteína GGDEF-EAL degenerada, BB2109, la sobreexpresión de *bdcA* no inhibe movilidad ni aumenta la formación de *biofilm*, sugiriéndonos que BdcA y este supuesto receptor de c-di-GMP probablemente participen en una vía común. Adicionalmente, mediante ensayos de infección en ratones por vía intranasal utilizando dosis de desafío bajas hemos demostrado que se requiere una dosis mayor de la cepa delecionada en *bdcA* respecto a la cepa silvestre para lograr una colonización eficiente de la cavidad nasal, la tráquea y los pulmones sugiriendo que BdcA podría cumplir un rol en las primeras etapas de la infección²³⁹.

Como describimos en el apartado anterior, unos de los mecanismos por los cuales el c-di-GMP promovería la formación de *biofilm* en *B. bronchiseptica* es a través del sistema Lap. la unión de LapD a c-di-GMP proporcionado por diguanilato ciclasas específicas permite mantener secuestrado a la proteasa LapG y evitar que la adhesina BrtA sea clivada y libertada de la membrana. La presencia de BrtA en la membrana favorecería a la adherencia de la bacteria y promovería la formación de *biofilm*¹⁷⁵.

Por otro lado, el último trabajo realizado por nuestro grupo se enfocó en estudiar qué proteínas están reguladas por c-di-GMP en *B. bronchiseptica*. Para este fin se realizaron estudios transcriptómicos y proteómicos empleando una cepa que sobreexpresa BdcA y una cepa que sobreexpresa una fosfodiesterasa (BB2664).

En términos generales, se encontró que numerosas proteínas relacionadas con el estrés oxidativo, el plegamiento de proteínas, el metabolismo de aminoácidos y del ácido nicotínico e incluso factores de virulencia estaban regulados por c-di-GMP. Resultó interesante encontrar que el aumento en los niveles de c-di-GMP reprimió el SST3 de *B. bronchiseptica* a nivel transcripcional. Mediante ensayos de citotoxicidad, midiendo la liberación de LDH en la línea celular de macrófagos murinos J774.A se observó que la cepa de *B. bronchiseptica* Bb-*pbdcA* resultó menos citotóxica que la cepa silvestre. Adicionalmente, ensayos de infección empleando un modelo murino demostraron que la cepa Bb-*pbdcA* también presenta una virulencia atenuada dado que se recuperaron menos bacterias viables del tracto respiratorio de los animales infectados 7 días post infección en comparación con la cepa parental²⁴⁰. Asimismo, la respuesta inmune de los animales infectados con Bb-*pbdcA* fue más débil que la de los animales infectados con la cepa control, ya que estimuló una menor secreción de citoquinas proinflamatorias y reclutó una menor cantidad de neutrófilos al sitio de la infección. 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 bacteria²⁴⁰.

En síntesis, este segundo mensajero parece estar implicado en la regulación de varios procesos celulares como la formación de *biofilm*, la movilidad y la virulencia en *B. bronchiseptica*.

Queda aún un extenso trabajo por hacer a fin de avanzar en la comprensión de cuáles son los actores que participan en la señalización por este segundo mensajero *B. bronchiseptica*, cuál es el rol de cada una de las diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas que intervienen, los efectores asociados y las vías de señalización implicadas. Así como también entender las señales a las que responden y como esas señales se integran dentro de esta compleja vía de señalización.

Hipótesis, objetivo general y objetivos específicos

El presente trabajo de Tesis Doctoral posee 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 del proyecto, es que se proponen avanzar sobre la determinación del rol de una diguanilato ciclasa presente tanto en *B. bronchiseptica* como en *B. pertussis*.

A fin de entender mejor el rol de c-di-GMP en la patogénesis de *B. bronchiseptica* elegimos estudiar el rol de BdcB (BB3903) en la regulación de fenotipos asociados a colonización e infección en el género *Bordetella*. Nuestra hipótesis de trabajo es que BdcB es una diguanilato ciclasa activa que participa de alguna de las etapas de la infección por *B. bronchiseptica*.

Para ello nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

- Analizar mediante análisis *in silico* e *in vitro* la posible actividad diguanilato ciclasa de BdcB.
- Determinar si BdcB participa en la formación de *biofilm* y en la movilidad de *B. bronchiseptica*
- Analizar el rol de BdcB en otros fenotipos relacionados a la patogénesis de la bacteria.
- Describir el rol de BdcB en el modelo de infección murino.

Capítulo 2: Análisis *in silico* e *in vitro* de BdcB

Introducción

En este capítulo iniciamos el estudio de la posible diguanilato ciclasa BB3903 de *B. bronchiseptica* a la cual a partir de aquí la denominaremos BdcB por su denominación en inglés *Bodetella diguanilate cyclase B*.

Como se describió en la introducción general, las diguanilato ciclasas están implicadas en la síntesis del segundo mensajero c-di-GMP. Estudios de estructura y secuencia de diguanilato ciclasas activas como WspR de *P. aeruginosa* y PleD de *C. crescentus*, las dos primeras en ser cristalizadas, han permitido obtener una extensa información acerca de la estructura de los dominios GGDEF presentes en estas enzimas, de los aminoácidos importantes para su actividad y sobre los mecanismos de regulación de estas. Se ha determinado que los dominios GGDEF presentan un plegamiento del tipo $\beta 1\alpha 1\alpha 2\beta 2\beta 3\alpha 3\beta 4$ y aminoácidos conservados importantes para su actividad, tales como es el motivo GGDEF del sitio activo, que son fundamentales tanto para la unión a GTP como para la coordinación de cationes Mg^{+2} o Mn^{+2} . La cristalografía de PleD en presencia de c-di-GMP ha permitido demostrar también la presencia de un motivo RxxD a una distancia de 5 aminoácidos *upstream* del sitio activo que es importante para ejercer una regulación negativa en la síntesis de c-di-GMP. El dímero de c-di-GMP intercalado unido a este sitio bloquea el movimiento del dominio GGDEF e inhibe la formación del homodímero catalíticamente competente. El estudio no solo de WspR y de PleD, sino también de un extenso número de diguanilato ciclasas ha demostrado que los dominios GGDEF generalmente no se encuentran aislados, sino que estas proteínas presentan, en sus regiones N-terminales, diversos dominios de sensado de las señales (por ejemplo, dominios REC, PAS, GAF, HAMP, entre otros) que les permiten responder a distintos estímulos ambientales y regular su actividad diguanilato ciclasa. Estos dominios estarían vinculados con los dominios GGDEF a través de un segmento helicoidal o motivo *coiled coil*^{193,197}.

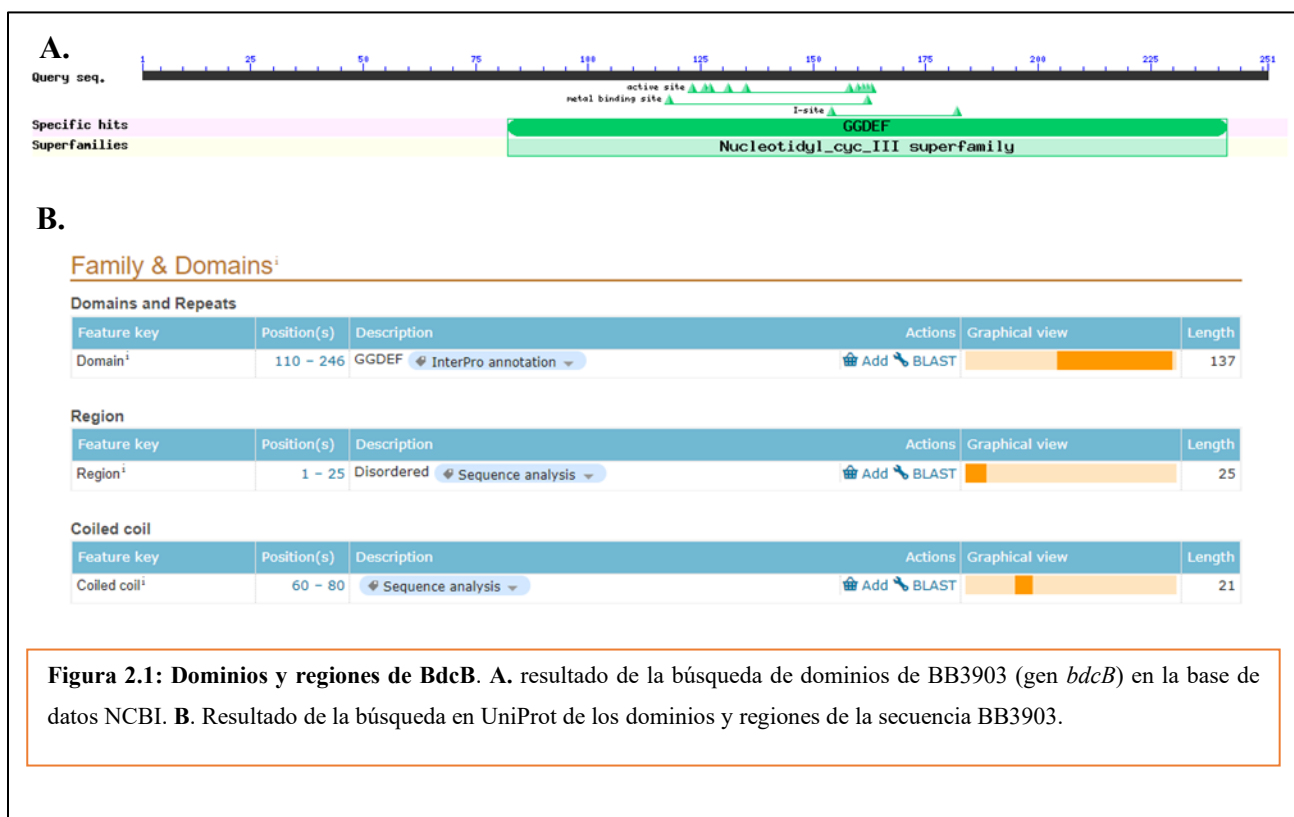
A partir de este conocimiento y empleando herramientas bioinformáticas, tales como BLAST²⁴¹, UniProt²⁴² y AlphaFold2²⁴³, en este capítulo analizamos las características a niveles de estructura primaria, secundaria y terciaria de la proteína BdcB identificando los motivos y dominios presentes en ésta. Además, alineamos y comparamos, empleando los servidores ClustalW²⁴⁴ y Weblogo²⁴⁵, la secuencia de BdcB con otras diguanilato ciclasas activas, tales como WspR y PleD, a fin de poder realizar predicciones sobre su posible actividad diguanilato ciclasa.

Con el objetivo de determinar si BdcB es una diguanilato ciclasa activa y evaluar la importancia de cada una de sus regiones para su funcionamiento, realizamos una serie de clonaciones con la secuencia de *bdcB* completa y con diferentes deleciones, y las empleamos para llevar a cabo ensayos *in vitro* de formación de *biofilm* en una cepa *P. fluorescens* que carece de 4 diguanilato ciclasas, y de formación de *biofilm* y movilidad en *B. bronchiseptica*.

Análisis *in silico* de BdcB

Comenzamos con la caracterización de esta proteína mediante un análisis *in silico*. En primer lugar, realizamos una búsqueda utilizando la base de datos de dominios CDD de NCBI (CCD: conserved Domain Database) y UniProtKB sobre la secuencia de BdcB (BB3903). En NCBI se observa que BdcB presenta una longitud de 251 aminoácidos con un dominio GGDEF en la región C-terminal (figura 2.1.A). Sobre éste se señala la presencia del sitio activo, el sitio de unión a metal que coincide con el sitio activo y el sitio I de inhibición. En la base de datos UniProt, además de identificar al dominio GGDEF en la región C-terminal, se reconoce, entre la posición de 60-80, un motivo *coiled coil* y sobre la región N-terminal, entre los aminoácidos 1 y 25, una región desordenada (figura 2.1.B).

Ninguna de las dos bases de datos identificó regiones transmembrana en BdcB, lo que nos sugiere que BdcB tendría una localización celular citoplasmática.



Seguidamente realizamos la predicción de la estructura terciaria de BdcB empleando el predictor de estructura AlphaFold2 y visualizamos dicha predicción empleando el programa UCFS Chimera²⁴⁶. El modelo obtenido se muestra en la figura 2.2.A, donde se puede ver el dominio GGDEF, el motivo *coiled coil* y la región desordenada en el extremo N-terminal de BdcB que identificados previamente con el servidor UniProt.

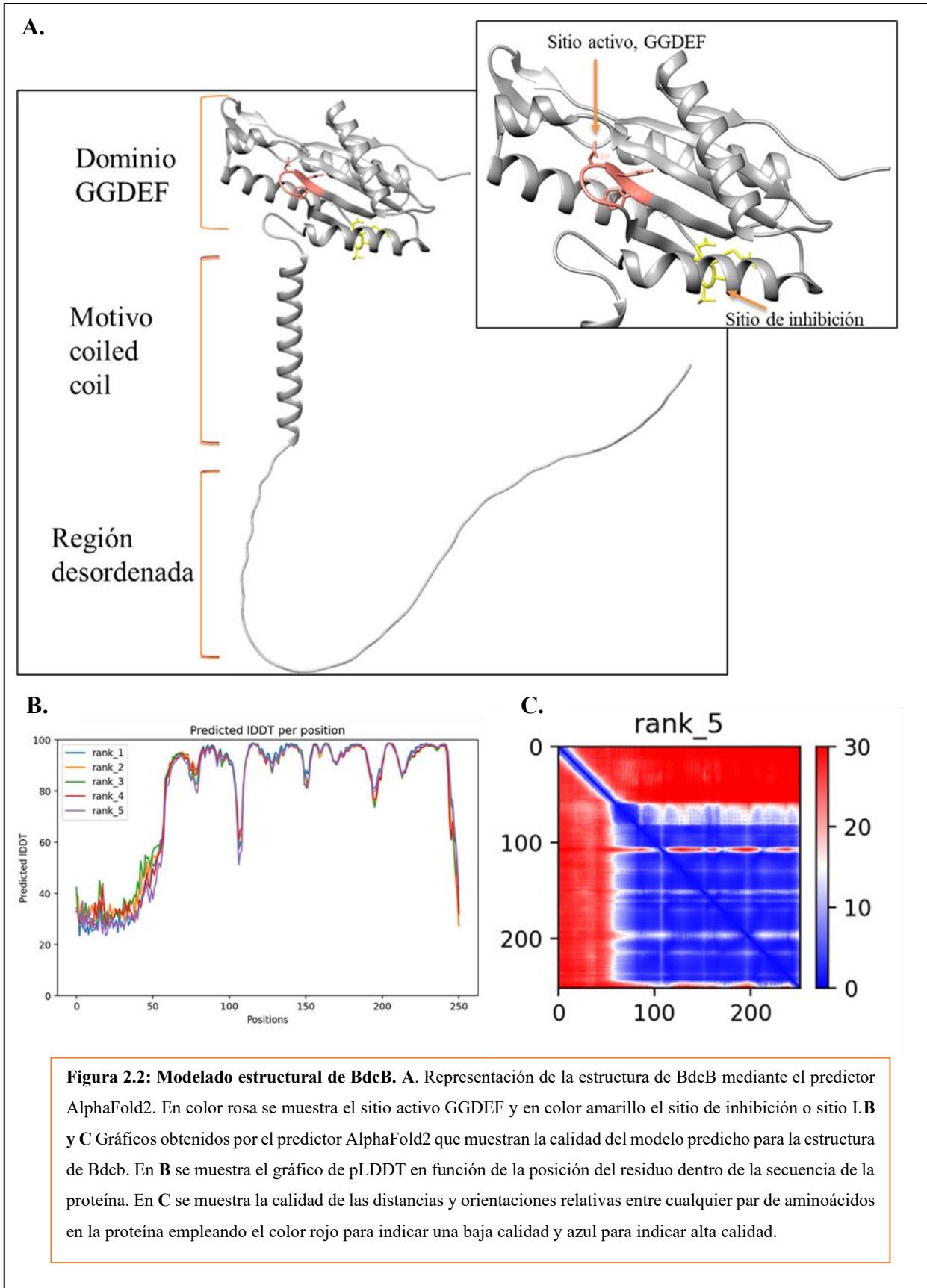
Capítulo 2

El predictor AlphaFold2 arroja como resultado 5 modelos. Cada uno de esos modelos presenta un *score* global como indicador de la calidad del modelo predicho, cuanto mayor es ese *score* global más cercana es la predicción del modelo comparado con la estructura por cristalografía obtenida para otras proteínas similares²⁴⁷. En este caso el modelado con mayor *score* es el modelo 5, el cual presenta un *score* global de 79,25, que es el que se empleó para representar la estructura de BdcB de la figura 2.2.A. Le sigue el modelo 1 con un *score* de 79,22, luego el 2 con 79,20 y por último los modelos 4 y 3 con *score*s globales de 78,73 y 78,07, respectivamente (los modelos del 1 al 4 no se muestran).

Para cada modelo, además, este servidor arroja un gráfico de pLDDT en función de la posición del residuo (figura 2.2.B). El pLDDT es un valor que se asocia con la calidad del modelo por residuo. Este valor va entre 0 a 100, donde un pLDDT entre 90 y 100 significa que el modelo es confiable, mientras que valores de pLDDT menores a 80 significan que la predicción en esa posición es de baja calidad. Para el caso de BdcB vemos que los valores de pLDDT obtenidos para la región N-terminal, comprendida entre los residuos 1 a 50 son menores a 40. Esta región coincide con la región de BdcB que el servidor Uniprot caracterizó como desordenada. Por otro lado, entre las posiciones 55 a 240 (correspondiente a las regiones del motivo *coiled coil* y del dominio GGDEF), los valores de pLDDT van entre 80 y 100, con algunos picos con valores de pLDDT bajos que coinciden con los *loops* de la proteína: uno en la posición 100 que coincide con el comienzo del dominio GGDEF, otro en la posición 151 que se corresponde con el sitio de inhibición RxxD y otro *loop* en la posición 165 que se corresponde con el sitio activo GGDEF.

Otra forma de analizar la calidad del modelo predicho por este programa es evaluar la calidad de las distancias y orientaciones relativas entre cualquier par de aminoácidos de la proteína. Para evaluar esto, el programa asigna colores que van del rojo al azul en función de una baja o alta calidad de predicción. El resultado obtenido para la predicción de BdcB se muestra en la figura 2.2.C. En este caso, el eje “x” presenta valores de 0 a 251 por la secuencia de aminoácidos de la proteína y de 0 a 251 en el eje de las “y” para comparar cada uno de los residuos con el resto de los residuos de la proteína. En rojo se muestra que la calidad de las distancias establecidas para los primeros 55 aminoácidos con respecto al resto de la proteína es baja. Mientras que la distancia relativa predicha entre los residuos que van de 56 a 251 es alta ya que esta región presenta una coloración azul.

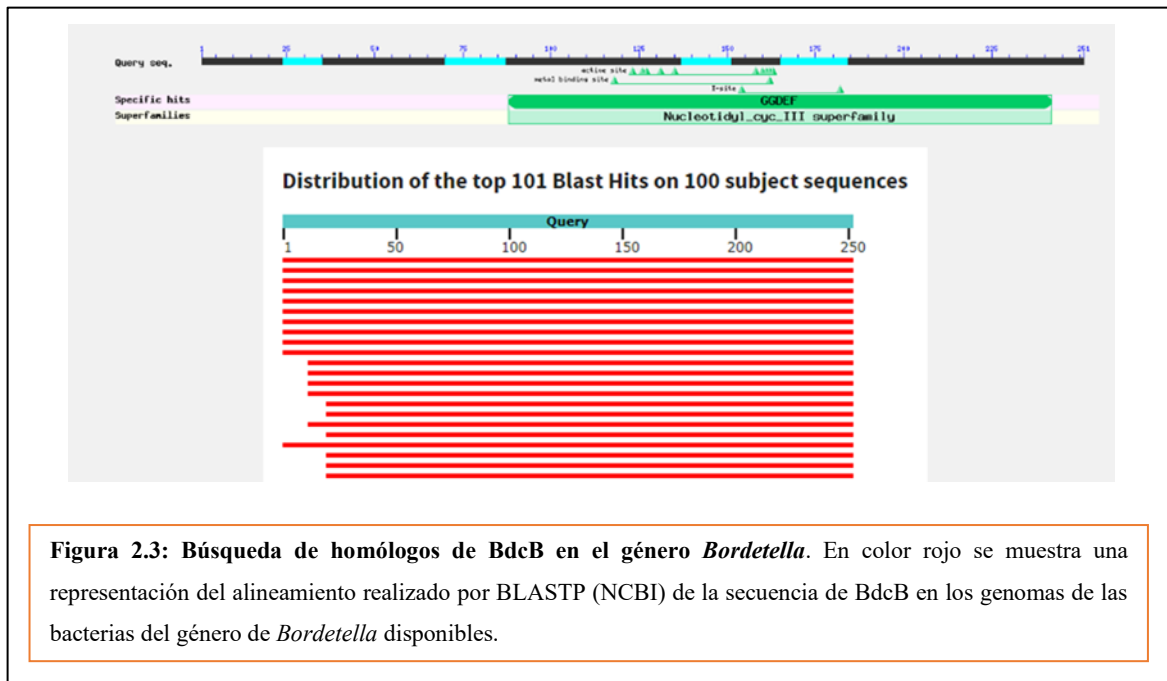
Por lo tanto, si bien obtuvimos un modelado de confianza aceptable para el dominio GGDEF y el motivo *coiled coil*, no logramos una buena predicción de la estructura de la región desordenada ya que los parámetros que definen la calidad del modelo son bajos para esta región.



Análisis de la región N-terminal

Como mencionábamos en la introducción las diguanilato ciclasas suelen presentar en sus regiones N-terminales dominios implicados en la detección de señales. Sin embargo, BdcB no presenta un dominio N-terminal característico de estas proteínas. A fin de determinar si BdcB tiene homología con alguna diguanilato ciclasa presente en otra bacteria, realizamos un BLASTP excluyendo al género *Bordetella* de la búsqueda. Como resultado de esta búsqueda, no encontramos ninguna proteína homóloga (BLASTP no mostrado).

Con el objetivo de determinar la importancia de esta región dentro de las bacterias del género *Bordetella*, realizamos una búsqueda en BLASTP incluyendo solamente al género de *Bordetella*. Y en este caso, encontramos que BdcB está presente solo dentro del grupo de las *Bordetellas* clásicas (*B. bronchiseptica*, *B. pertussis* y *B. parapertussis*) y existen aislamientos que presentan deletados los primeros 20 aminoácidos de la región N-terminal (Figura 2.3). Mientras que los 35 aminoácidos siguientes de esta región se encuentran conservados, lo cual sugiere que esta región podría tener un rol importante en la función de esta proteína.



Análisis *in silico* del dominio GGDEF de BdcB

Las diguanilato ciclasas activas presentan en sus dominios GGDEF un plegamiento del tipo $\beta 1\alpha 1\alpha 2\beta 2\beta 3\alpha 3\beta 4$ con los aminoácidos del sitio activo GGDEF y otros residuos importantes para su correcto plegamiento y función altamente conservados¹⁹⁷.

Capítulo 2

Como podemos ver en la figura 2.2.A el plegamiento tipo $\beta 1\alpha 1\alpha 2\beta 2\beta 3\alpha 3\beta 4$ característico de estas enzimas se encuentra conservado en BdcB.

A fin de identificar si BdcB además presenta todos los aminoácidos importantes para que sea una diguanilato ciclasa activa realizamos un análisis de la secuencia del dominio GGDEF de BdcB comparándolo con secuencias de dominios GGDEF de diguanilato ciclasas para las cuales ya ha sido demostrada su actividad.

Para llevar a cabo este estudio realizamos una búsqueda bibliográfica de diguanilato ciclasas activas, obtuvimos la secuencia de aminoácidos de los dominios GGDEF empleando el servidor UniProt y comparamos las secuencias con la secuencia del dominio GGDEF de BdcB mediante un alineamiento empleando el servidor ClustalW²⁴⁴.

Los resultados del alineamiento se muestran en la figura 2.4.

En este alineamiento podemos ver que entre las láminas $\beta 2$ y $\beta 3$ se encuentra el motivo GGDEF conservado dentro de todas las diguanilato ciclasas analizadas incluyendo a BdcB (recuadro rojo). En color azul se señalan también otros aminoácidos conservados importantes, como el residuo de aspartato (D) en $\beta 1$, que junto con el aspartato del motivo GGDEF coordinan el Mg^{+2} que es crítico para la catálisis. En $\beta 2$ se puede observar la arginina conservada que permitiría la correcta conformación del *β -harpin (o loop)* que contiene al motivo GGDEF. También en la hélice $\alpha 1$ se señala la asparagina y en $\alpha 2$ el residuo de aspartato que interaccionarían con la base guanina del sustrato.

La mayoría de las secuencias analizadas también revelaron un motivo común ubicado entre la hélice $\alpha 2$ y la lámina $\beta 2$ con la secuencia RxxD donde x es cualquier aminoácido (recuadro amarillo). Como se describió en la introducción general de la tesis este motivo es denominado sitio I, o de inhibición y establece un modo de inhibición de tipo *feedback* negativo por parte del producto de catálisis, característico de la mayoría de estas enzimas. Como se puede ver en el alineamiento, BdcB también presenta este sitio I con una secuencia RTSD, que en la figura 2.2.A donde se muestra el modelado de la estructura de BdcB, se marca en amarillo quedando en posición opuesta al sitio activo GGDEF (color rosa anaranjado).

A partir del alineamiento realizado, analizamos la conservación de cada aminoácido en función de la posición empleando el programa Weblogo. Este programa pone de manifiesto la conservación de un determinado aminoácido y lo grafica en función del tamaño de la letra del aminoácido conservado. Una letra de mayor tamaño representa una mayor conservación de ese aminoácido en esa posición²⁴⁵.

Los mismos residuos marcados en el alineamiento se visualizan mejor en el Weblogo realizado donde podemos ver que los residuos importantes para la estructura, función y regulación de este dominio se encuentra conservado en las diguanilato ciclasas activas y en BdcB (figura 2.5).

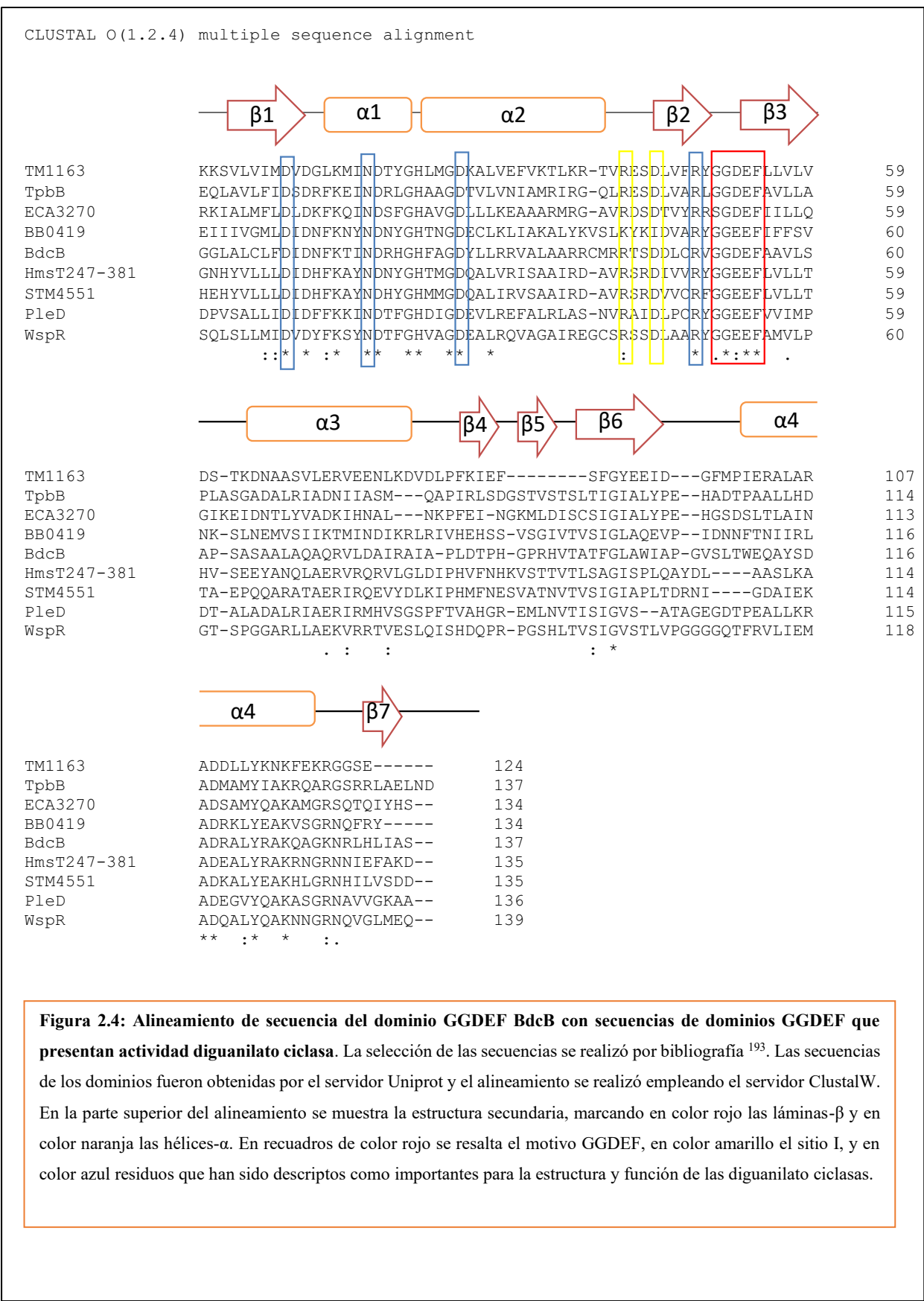
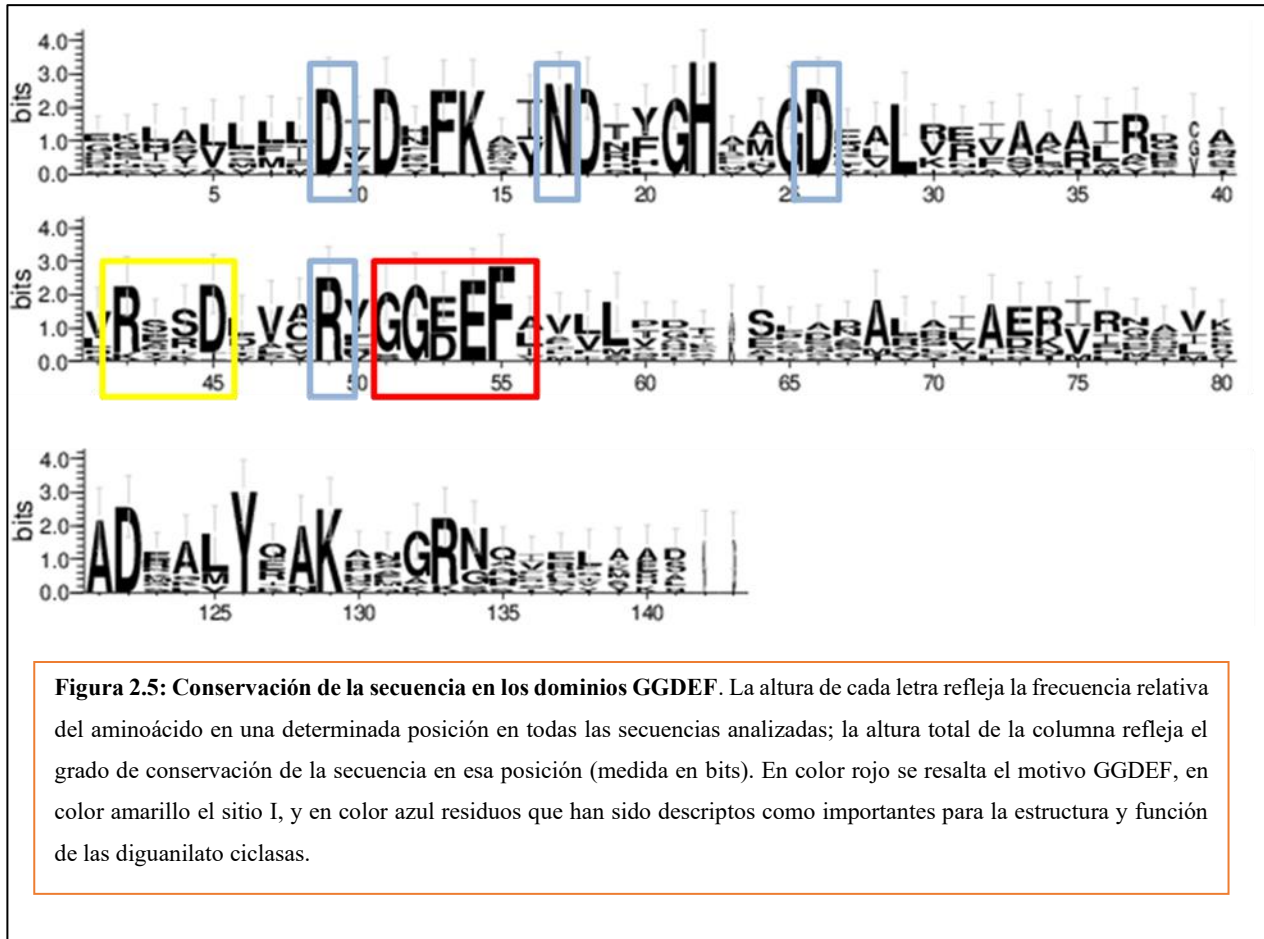


Figura 2.4: Alineamiento de secuencia del dominio GGDEF BdcB con secuencias de dominios GGDEF que presentan actividad diguanilato ciclasa. La selección de las secuencias se realizó por bibliografía¹⁹³. Las secuencias de los dominios fueron obtenidas por el servidor Uniprot y el alineamiento se realizó empleando el servidor ClustalW. En la parte superior del alineamiento se muestra la estructura secundaria, marcando en color rojo las láminas-β y en color naranja las hélices-α. En recuadros de color rojo se resalta el motivo GGDEF, en color amarillo el sitio I, y en color azul residuos que han sido descritos como importantes para la estructura y función de las diguanilato ciclasas.



Análisis *in silico* del motivo *coiled coil* de BdcB

Como mencionamos anteriormente, BdcB presenta en su secuencia un motivo *coiled coil* contiguo al dominio GGDEF (figura 2.2.A).

Este motivo se ha encontrado en varias diguanilato ciclasas por estar vinculando el dominio GGDEF con el dominio sensor o de entrada de la señal. Se caracteriza por presentar una secuencia rica en residuos de leucinas en un patrón LxxxxxxLxxxxxxLxxL y por la presencia de otros residuos hidrofóbicos que resultan ser clave para la oligomerización ya que permiten que el segmento de un monómero interactúe con el segmento del otro monómero mediante interacciones hidrofóbicas para producir el dímero. Para el caso de BdcB encontramos que este motivo presenta la secuencia:

TLQELQAQVDTLELENARLRRRALTD Motivo *coiled coil* de BdcB

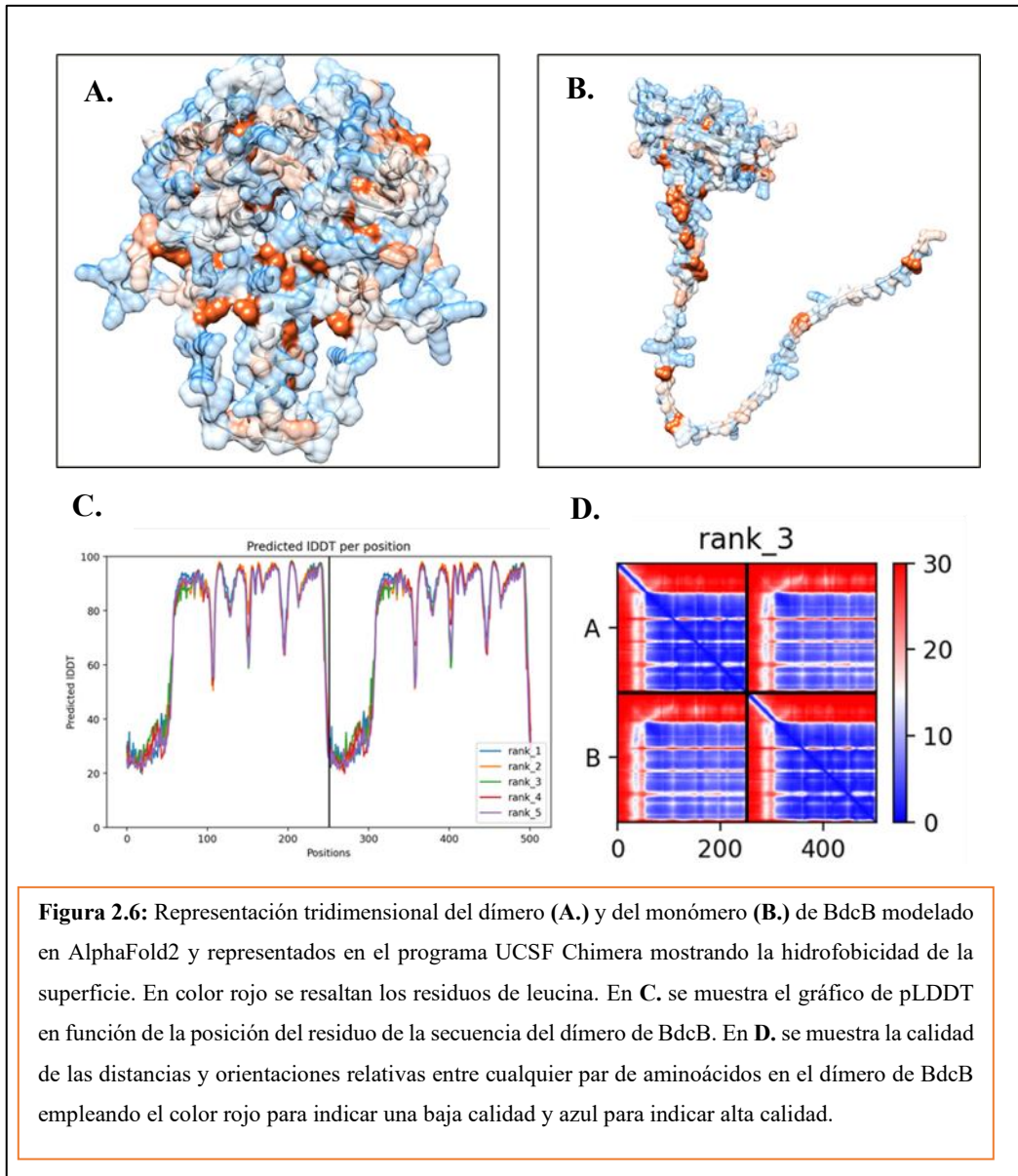
En esta secuencia se puede ver en rojo la presencia de residuos hidrofóbicos, y en amarillo la presencia de las leucinas en el patrón predicho para este tipo de segmento.

Capítulo 2

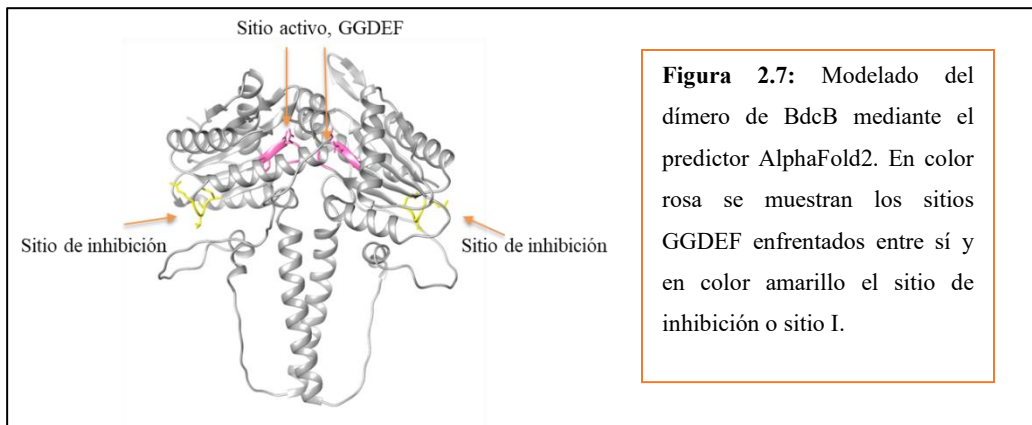
Empleando el modelo predicho por AlphaFold2 para el monómero de BdcB y realizando el modelado para el dímero de BdcB, representamos en el programa UCSF Chimera el monómero y el dímero de BdcB visualizando en color rojo anaranjado las leucinas.

Para el caso del monómero se observa que las leucinas del motivo *coiled coil* forman una línea central y, en el dímero de BdcB, estas leucinas interaccionan con las leucinas del otro monómero quedando estas regiones hidrofóbicas hacia el interior del dímero (Figura 2.6.A y Figura 2.6.B).

En la figura 2.6.C y 2.6.D se muestran los gráficos que dan cuenta de la calidad del modelo obtenido para el dímero. En este caso, el modelo con mayor score global es el modelo 3, que se muestra en la figura 2.6.A. Nuevamente, se puede ver que el modelo muestra una buena predicción para los dominios GGDEF y el motivo *coiled coil*, mientras que la predicción para la región N-terminal no es buena. Respecto a la predicción entre los monómeros del dímero, la posición relativa de los dominios GGDEF entre sí y los motivos *coiled coil* entre sí sigue siendo buena pero la predicción de las regiones N-terminales entre sí y su posición relativa con el resto del dímero no es buena.



Este motivo *coiled coil*, además de ser importante para permitir la dimerización de los monómeros, estaría implicado en la traducción de la señal que se percibe desde la región N-terminal al dominio GGDEF produciendo cambios conformacionales dentro de la proteína que permitan mantener los sitios GGDEF alineados para que se lleve a cabo la síntesis de c-di-GMP (Figura 2.7).



A partir de este análisis podemos concluir que el dominio GGDEF de BdcB presenta la estructura y la secuencia característica de las diguanilato ciclasas activas. En particular, tiene conservados todos los aminoácidos que, en otras diguanilato ciclasas activas, se han demostrado que son fundamentales para catalizar la síntesis de c-di-GMP. Además, presenta un motivo *coiled coil* que permitiría la dimerización a través de los aminoácidos hidrofóbicos que se encuentran en este motivo, en el que participarían principalmente residuos de leucinas. Finalmente, sobre la región N-terminal identificamos una región desordenada aún no descrita en ninguna otra diguanilato ciclasa, cuya función es aún desconocida para nosotros.

Análisis *in vitro* de la posible actividad diguanilato ciclasa de BdcB

-Expresión heteróloga de *bdcB* en *P. fluorescens*

A partir del análisis *in silico* podemos hipotetizar que BdcB sería una diguanilato ciclasa activa dado que presenta el sitio activo GGDEF conservado, así como también los aminoácidos que permitirían su correcto plegamiento y la coordinación de los metales requeridos para la actividad diguanilato ciclasa.

A fin de confirmar experimentalmente si BdcB presenta actividad diguanilato ciclasa, la importancia del sitio catalítico para su actividad y el rol de la región desordenada N-terminal, empleamos una estrategia que consiste en la expresión heteróloga del gen *bdcB* en *P. fluorescens*.

P. fluorescens es uno de los organismos modelo en el área de estudio de *biofilm* y en la regulación de este proceso a través de c-di-GMP. Mediante la mutación sistémica de todas las posibles diguanilato ciclasas, Newell y sus colaboradores demostraron que en medio mínimo conteniendo glicerol y triptona como fuentes de carbono y nitrógeno (medio K10-T), sólo cuatro diguanilato ciclasas están involucradas en el control de la formación de *biofilm* de esta bacteria: WspR, GcbA, GcbB y GcbC. En consecuencia, la delección de estas cuatro diguanilato ciclasas (*Pf*Δ4DGC) le impide a la bacteria formar *biofilm* en las

Capítulo 2

condiciones descriptas²⁴⁸. En el contexto de esta cepa, la expresión de diguanilato ciclasas activas de *P. fluorescens* genera un aumento en la formación de *biofilm*. Por este motivo, nuestro grupo de investigación ha aprovechado esta cepa en el pasado como una herramienta para el estudio de diguanilato ciclasas de *B. bronchiseptica*¹⁷¹. Si la expresión de una proteína con dominio GGDEF genera un aumento en la formación de *biofilm*, es una evidencia importante para sostener que dicha proteína es una diguanilato ciclasa activa.

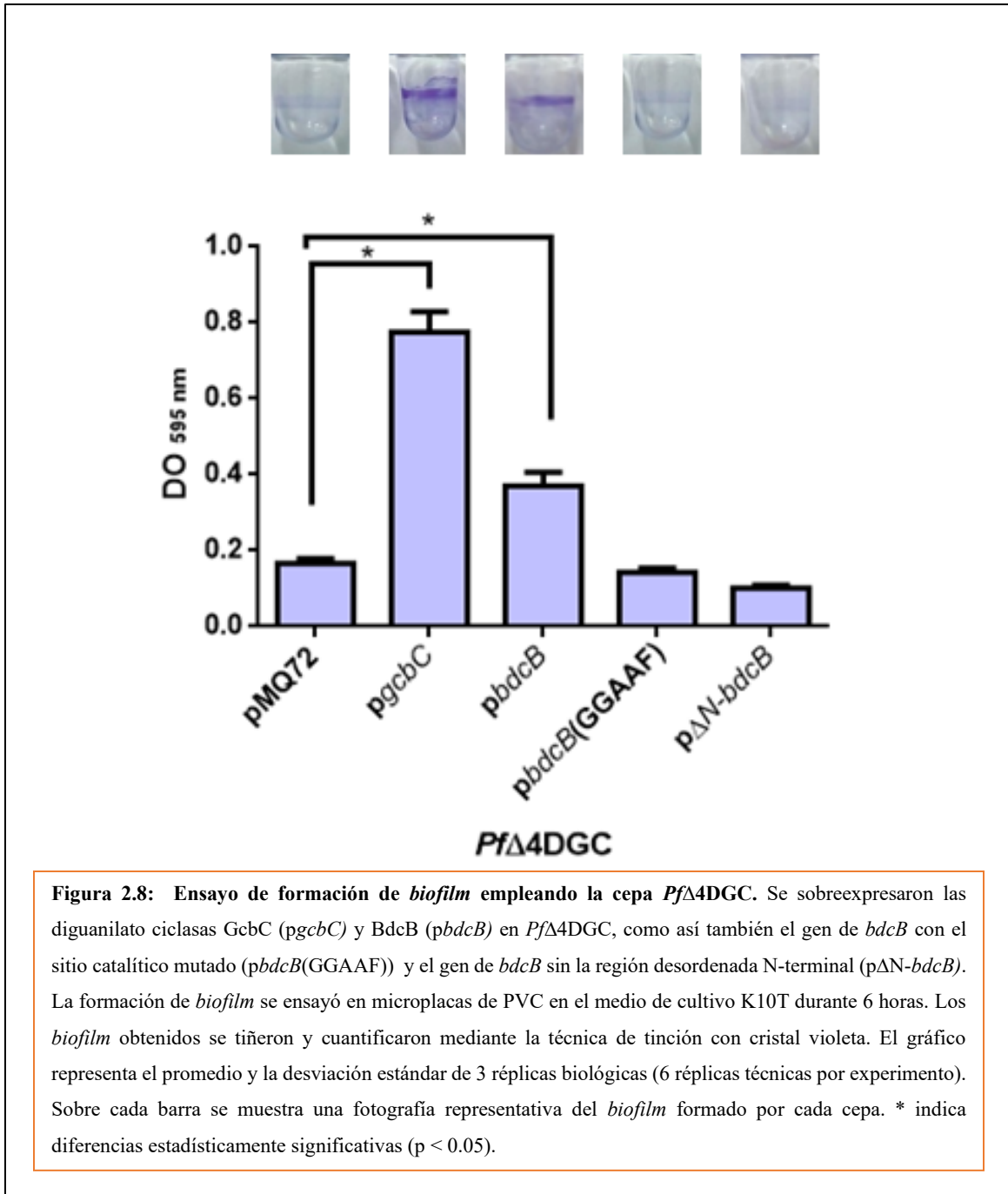
Realizamos entonces la expresión heteróloga de *bdcB* en la cepa *Pf*Δ4DGC (*Pf*Δ4DGC*p**bdcB*) y ensayamos la formación de *biofilm* en el medio K10-T en microplacas de PVC. La expresión de *bdcB* la obtuvimos clonando el gen de *bdcB* en el plásmido pMQ72, replicativo en *P. fluorescens*, bajo el promotor P_{BAD} inducible por arabinosa.

Además, con el propósito de evaluar si la actividad diguanilato ciclasa se debe a la presencia del sitio catalítico conservado GGDEF, expresamos en la cepa *Pf*Δ4DGC (también bajo el promotor P_{BAD}) una construcción de *bdcB* con el sitio catalítico mutado, cambiando la secuencia del motivo GGDEF por GGAAF (*Pf*Δ4DGC*p**bdcB*(GGAAF)). La introducción de mutaciones en el sitio catalítico se realizó por doble recombinación homóloga. Esta estrategia ya ha sido empleada por varios grupos de investigación y se ha demostrado que, en diguanilato ciclasas activas, el cambio de los aminoácidos del sitio activo por dos alaninas suprime la actividad de la enzima²³⁶.

A fin de identificar si la región desordenada presente en el extremo N-terminal de BdcB también es importante para la funcionalidad de la enzima incluimos en este ensayo de formación de *biofilm* a la cepa *Pf*Δ4DGC*p*ΔN-*bdcB*. Esta cepa de *Pf*Δ4DGC presenta al plásmido pMQ72 conteniendo a la secuencia de *bdcB* sin los primeros 165 nucleótidos que codifican para los primeros 55 aminoácidos correspondientes a la región desordenada.

Como control positivo empleamos la cepa *Pf*Δ4DGC transformada con el plásmido pMQ72 conteniendo al gen *gcbC* que codifica para diguanilato ciclasa propia de *P. fluorescens* bajo el control del promotor P_{BAD} (*Pf*Δ4DGC*p**gcbC*), y como control negativo a la cepa *Pf*Δ4DGC transformada con el plásmido pMQ72 sin inserto (*Pf*Δ4DGC*p*MQ72).

Para la cuantificación de la formación de *biofilm* empleamos la técnica de tinción con cristal violeta. Los resultados se muestran a continuación (Figura 2.8):



Como se observa en la figura 2.8, la cepa *PfΔ4DGC*pMQ72 presenta una capacidad nula de formación de *biofilm*, mientras que la sobreexpresión de *gcbC* y *bdcB* inducen un aumento significativo en la formación de *biofilm*. Por otra parte, se observa también que la formación de *biofilm* de la cepa que sobreexpresa *bdcB* es de menor magnitud al que formó la cepa *PfΔ4DGC**pgcbC*. Esto no es llamativo para nosotros ya que, en nuestra experiencia, otras diguanilato ciclasas activas de *B. bronchiseptica* no fueron

capaces de generar un aumento equivalente al que genera la diguanilato ciclasa propia de *P. fluorescens* GcbC¹⁷¹.

Cuando complementamos la cepa *Pf*Δ4DGC con la versión de *bdcB* con el sitio catalítico mutado (*pbdcB*(GGAAF)) se observó un comportamiento indistinguible de la cepa *Pf*Δ4DGC transformada con el vector sin inserto. La cepa (*Pf*Δ4DGCpΔN-*bdcB*) también fue incapaz de revertir el fenotipo no formador de *biofilm* de *Pf*Δ4DGCpMQ72.

En resumen, estos resultados representan el primer ensayo *in vitro* que pone en manifiesto la actividad diguanilato ciclasa de BdcB. Asimismo, estos resultados sugieren que no solo el sitio catalítico GGDEF es indispensable para su actividad sino también la región N-terminal.

-Sobreexpresión de BdcB en *B. bronchiseptica*

Nuestro grupo de trabajo demostró previamente que los fenotipos de formación de *biofilm* y de movilidad en *B. bronchiseptica* se encuentran regulados por c-di-GMP, y que la sobreexpresión de una diguanilato ciclasa activa genera un aumento en la formación de *biofilm* y una inhibición en la movilidad¹⁷¹.

Con este antecedente, estudiamos estos fenotipos en *B. bronchiseptica* al sobreexpresar *bdcB*, *bdcB* con el sitio catalítico mutado y *bdcB* con la región N-terminal deletada.

Para realizar estas construcciones clonamos las secuencias correspondientes en el plásmido de alto número de copias pBBRMCS5 replicativo en *B. bronchiseptica*, bajo el control del promotor P_{npII}, un promotor fuerte y de expresión constitutiva en *Bordetella spp*²⁴⁹. Además, incluimos en la región C-terminal una secuencia que codifica para un péptido de 9 residuos de aminoácidos derivados de la hemaglutinina del virus de la gripe para facilitar la detección de las proteínas por *western blot* (etiqueta HA).

Tanto para los ensayos de formación de *biofilm* como de movilidad incluimos como control la cepa *B. bronchiseptica* transformada con el vector pBBRMCS5 sin inserto (*Bbp*vacío).

Los ensayos de formación de *biofilm* los realizamos en microplacas de PVC en medio Stainer-Scholte (SS), un medio sintético y específico para *B. bronchiseptica*, el cual fue suplementado con una concentración final de 1,0 mM de ácido nicotínico a fin de inducir a la bacteria a una fase de virulencia intermedia. Seleccionamos esta condición ya que en esta fase la formación de *biofilm* es máxima y, además, es una de las condiciones en la que está reportado que el incremento en los niveles de c-di-GMP conduce a un aumento en la formación de *biofilm*^{170,171} (la formación de *biofilm* en función a las fases de virulencia se verá en más detalle en el próximo capítulo).

Los *biofilm* formados fueron cuantificados empleando la técnica de cristal violeta. Los resultados se muestran en la figura 2.9.A. En primer lugar, vemos que la sobreexpresión de una copia silvestre de BdcB induce un aumento significativo en la formación de *biofilm* respecto a la cepa *Bbp*vacío. Por otro

Capítulo 2

lado, la sobreexpresión de las versiones *bdcB*(GGAAF) y Δ N-*bdcB* no fueron capaces de aumentar la formación de *biofilm* y no produjeron diferencias significativas respecto de la cepa control *Bbp*vacío.

En cuanto a los ensayos de movilidad, los realizamos en medio SS semi-sólido suplementado con 40 mM de MgSO₄ para inducir a la bacteria a la fase avirulenta, que es la fase en la cual la bacteria expresa el flagelo y por lo tanto es capaz de moverse.

Los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en la figura 2.9.B donde se puede ver que la cepa *Bbp*vacío presenta una movilidad del tipo *swimming* tal como ya había sido reportado por nosotros y otros autores¹⁷¹. La cepa *BbpbdcB* presentó una movilidad significativamente menor mientras que las cepas *BbpbdcB*(GGAAF) y *Bbp* Δ N-*bdcB* presentaron una movilidad similar a la cepa *Bbp*vacío.

Por último, mediante la técnica de *western blot* confirmamos la expresión de las tres construcciones: Δ N-BdcB-HA; BdcB(GGAAF)-HA y BdcB-HA empleado anticuerpos anti-hemaglutinina (anti-HA). El resultado obtenido se muestra en la figura 2.9.C donde podemos ver la expresión de estas tres construcciones en una banda del tamaño aproximado de 28,5 kDa correspondiente al tamaño esperado para BdcB.

En conclusión, todos los ensayos realizados evidencian que BdcB sería una diguanilato ciclasa activa y que tanto los aminoácidos del sitio activo GGDEF como la región desordenada N-terminal, serían importantes para su actividad en *B. bronchiseptica*.

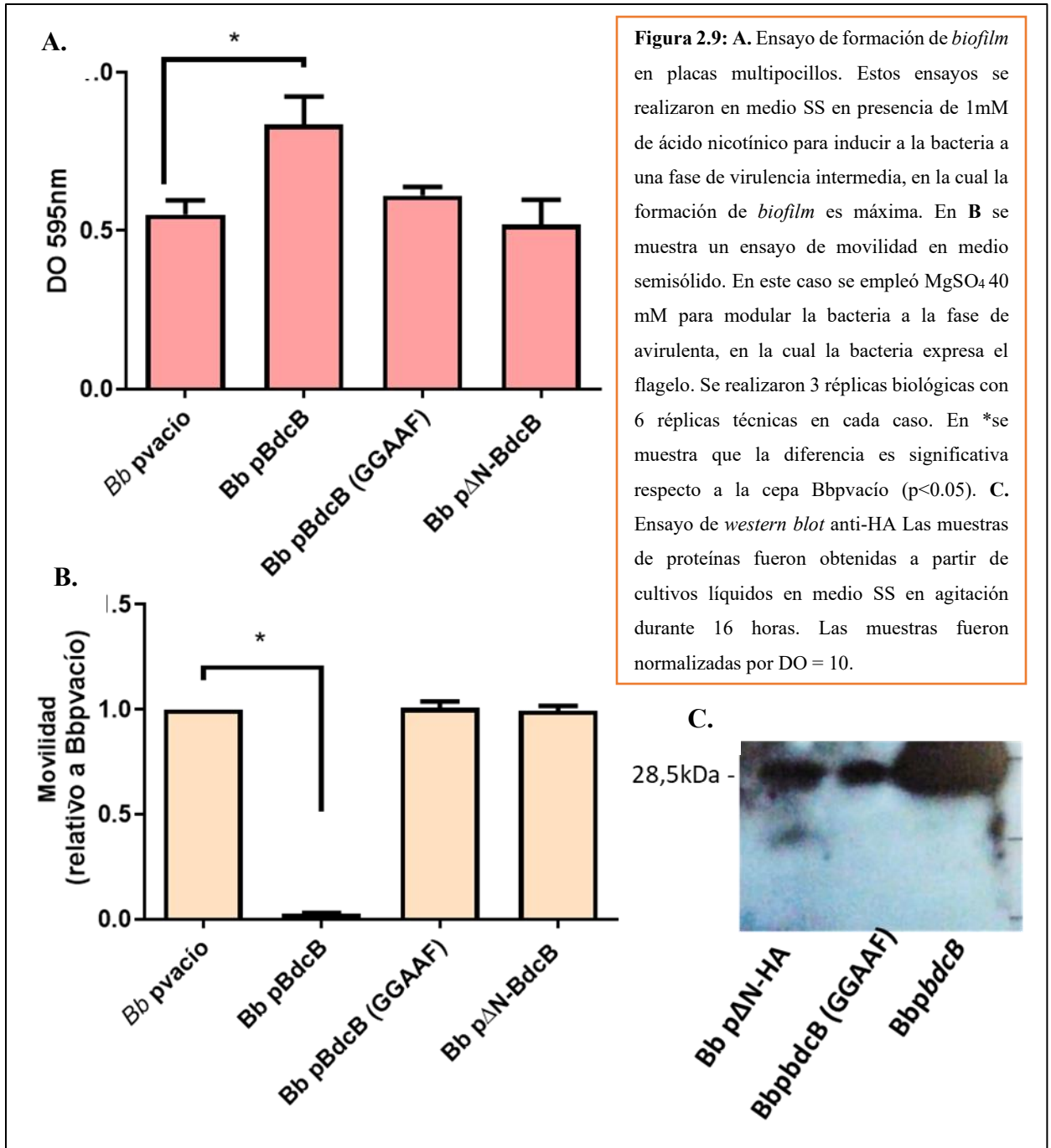


Figura 2.9: A. Ensayo de formación de *biofilm* en placas multipocillos. Estos ensayos se realizaron en medio SS en presencia de 1mM de ácido nicotínico para inducir a la bacteria a una fase de virulencia intermedia, en la cual la formación de *biofilm* es máxima. En B se muestra un ensayo de movilidad en medio semisólido. En este caso se empleó MgSO₄ 40 mM para modular la bacteria a la fase de avirulenta, en la cual la bacteria expresa el flagelo. Se realizaron 3 réplicas biológicas con 6 réplicas técnicas en cada caso. En *se muestra que la diferencia es significativa respecto a la cepa Bb pvacio (p<0.05). C. Ensayo de *western blot* anti-HA. Las muestras de proteínas fueron obtenidas a partir de cultivos líquidos en medio SS en agitación durante 16 horas. Las muestras fueron normalizadas por DO = 10.

Análisis de la región N-terminal en BdcB *in vivo*

Los resultados presentados anteriormente muestran que la región desordenada del extremo N-terminal resulta ser importante para la actividad enzimática, sin embargo, desconocemos de qué manera puede estar interviniendo. Nuestra hipótesis es que esta región es requerida para la dimerización de la enzima, un paso crucial para la catálisis.

Para corroborar esta hipótesis nos propusimos en primer lugar, demostrar mediante la técnica de doble híbrido en bacteria, que BdcB es capaz de dimerizar y luego, analizar si la ausencia de esta región N-terminal afecta la dimerización propiamente dicha.

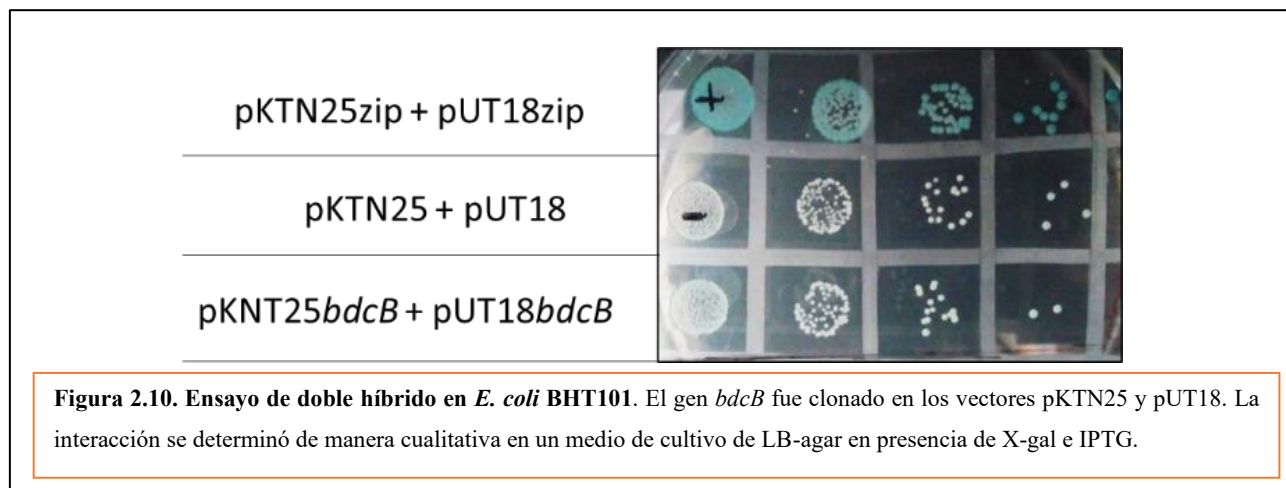
El ensayo de doble híbrido que empleamos (BACTH, *Bacterial Adenylate Cyclase Two Hybrid System*) es una herramienta versátil que permite evaluar la interacción proteína-proteína *in vivo* mediante la utilización de la enzima adenilato ciclasa (CyaA) de *B. pertussis* como reportero de esta interacción.

El dominio catalítico de la CyaA puede ser dividido en dos fragmentos, el T25 y el T18. Cuando estos dos fragmentos son co-expresados independientemente no se observa actividad CyaA, mientras que, si estos son co-expresados como parte de fusiones transcripcionales a otras proteínas con capacidad de interactuar entre sí, estos dos fragmentos recuperan su actividad y, por lo tanto, hay producción de AMPc.

El aumento de AMPc dentro de la célula conduce a un aumento en la expresión del operón *lac*, que codifica para los genes implicados en el metabolismo de la lactosa, uno de ellos es el gen de la β -galactosidasa. Con lo cual, la medida de la actividad β -galactosidasa, nos permite determinar de manera cuantitativa y/o cualitativa la capacidad de interacción de las dos proteínas. En este caso la empleamos para ensayar interacción entre los dos monómeros de BdcB.

Con este objetivo clonamos el gen de *bdcB* tanto en el vector pKNT25 como en el pUT18 y analizamos la interacción co-transformando los vectores en la cepa de *E. coli* BTH101. La evaluación de la interacción la realizamos de manera cualitativa agregando X-gal al medio de cultivo (un sustrato de la β -galactosidasa, que al ser metabolizado produce una coloración azul).

Como control positivo empleamos las construcciones pKNT25-*zip* y pUT18-*zip* que codifican para un motivo denominado “cierre de leucinas” capaz de dimerizar. Como control negativo empleamos los vectores pKNT25 y pUT18 sin inserto. El resultado obtenido se muestra en la figura 2.10, donde se observa que el control positivo presenta una coloración azul esperada, mientras que el control negativo no presenta coloración. Por otro lado, las construcciones realizadas con el gen dieron similares al control negativo, es decir que mediante esta técnica no pudimos demostrar la dimerización de BdcB.



Este resultado negativo nos impidió seguir avanzando en la estrategia planteada para avanzar en la caracterización de la región N-terminal.

Como segunda opción, realizamos un segundo ensayo de doble híbrido, pero esta vez clonamos solamente la región N-terminal y el motivo *coiled coil* en los vectores pKNT25 y pUT18, sin embargo, esta estrategia tampoco nos sirvió para demostrar la dimerización (placa no mostrada).

Discusión

En este capítulo iniciamos el estudio de la diguanilato ciclasa BB3903, BdcB de *Bordetella bronchiseptica*. En primer lugar, empleamos las herramientas bioinformáticas disponibles para iniciar esta caracterización. Mediante una búsqueda en NCBI y UniProt pudimos conocer que BdcB presenta una longitud de 251 aminoácidos sin regiones transmembranas, lo que sugiere que se localiza en el citoplasma de la bacteria. Mediante estos servidores también identificamos la presencia de una región desordenada sobre el extremo N-terminal, un motivo *coiled coil* adyacente a éste y un dominio GGDEF en la región C-terminal. Como describimos en la introducción, en general, las diguanilato ciclasas presentan el dominio GGDEF sobre la región C-terminal, pero presentan también, sobre el extremo N-terminal, dominios sensores de la señal tales como PAS, GAF, o de fosforilación (dominios REC). BdcB no presenta ninguno de los dominios conocidos. A fin de buscar homólogos de BdcB en otras bacterias realizamos una búsqueda en el servidor BLASTP excluyendo al género de *Bordetella*. Sin embargo, no pudimos encontrar ningún homólogo. Además, también por una búsqueda en BLASTP, pudimos identificar la presencia de BdcB solo dentro del grupo de las *Bordetellas* clásicas, lo que resalta un rol específico de esta proteína en este grupo.

También realizamos la predicción de su estructura terciaria empleando el servidor Alpha Fold2. Este servidor es uno de los servidores más nuevos en el campo de la bioinformática que está empezando a diferenciarse del resto de los servidores por la calidad de los modelos estructurales que predice. Además de presentar modelos de alta calidad, puntúa con un *score* global al modelo predicho y arroja gráficos que dan cuenta de la calidad de ese modelo. Permite evaluar no solo la calidad del modelo en general, sino también la calidad del modelo por residuo y entre pares de residuos.

En nuestro caso, estos gráficos permitieron asegurarnos de que la calidad del modelo predicho para la región del dominio GGDEF y del motivo *coiled coil* es alta, con valores de pLDDT entre 80 y 100, mientras que la calidad del modelo es baja para la región desordenada, con valores de pLDDT entre 20 y 40. De manera similar, la calidad de las distancias relativas entre los aminoácidos de esta región con el resto de los aminoácidos de la proteína también fue baja, con lo cual no logramos obtener un modelo aceptable para la región desordenada N-terminal. Podemos asociar la incapacidad de esta región desordenada de tener una estructura estable en solución a su composición de aminoácidos. En esta región BdcB presenta una baja abundancia, solo el 10 %, de aminoácidos hidrofóbicos y/o voluminosos (Val, Ile, Met Phe, Trp, Tyr) que son la base de las proteínas globulares, y promueven un plegamiento espontáneo, mientras que posee una alta proporción, el 75 %, de aminoácidos cargados o polares (Gln, Ser, Pro, Glu, Lys, Arg) y aminoácidos pequeños (Gly, Ala) característico en las proteínas desordenadas²⁵⁰. La flexibilidad o maleabilidad de esta región podría permitirle adoptar diferentes estructuras funcionales y/o reconocer diversos ligandos. Por ejemplo, de acuerdo con la situación metabólica de la célula es posible que se modifique el pH intracelular,

Capítulo 2

el contenido de ciertos iones, el estado oxidante, el agua disponible, entre otros; lo cual podría favorecer una u otra estructura y, por tanto, una u otra función. Dependiendo de las fases de crecimiento, o las fases de virulencia de la bacteria podrían estar presentes ciertas moléculas y/o proteínas y otras no, lo que favorecería la interacción con éstas en un estadio determinado y con otras en uno diferente, y, por tanto, en cada caso favorecer o no la actividad de BdcB.

A continuación, profundizamos en el estudio del dominio GGDEF y el motivo *coiled coil*. Para llevar a cabo el estudio del dominio GGDEF de BdcB realizamos un alineamiento comparando la secuencia del dominio GGDEF de BdcB con secuencias de diguanilato ciclasas con actividad demostrada, incluidas las secuencias de los dominios GGDEF de WspR de *P. aeruginosa* y PleD de *C. crescentus*, las dos primeras diguanilato ciclasas en ser cristalizadas y que proporcionaron información valiosa sobre las conformaciones activas e inactivas de estas enzimas, unión de sustrato, mecanismo catalítico e inhibición del producto^{251,252}. A partir de este alineamiento, realizamos un Weblogo para poder identificar la conservación de los aminoácidos. En este estudio identificamos en BdcB los aminoácidos del sitio activo GGDEF, conservados. También identificamos la presencia de otros aminoácidos descriptos como importantes para la actividad diguanilato ciclasa como el aspartato de $\beta 1$ que junto con un aspartato del motivo GGDEF (que a veces es un glutamato en las diguanilato ciclasas) coordinan, en ambos casos, los dos iones Mg^{+2} que son críticos para la catálisis. También identificamos la arginina conservada en $\beta 2$ que sería importante para favorecer la conformación del *loop* del motivo GGDEF. Con lo cual, todos estos datos nos sugieren fuertemente que BdcB puede tener actividad.

Es de destacar que existen en la naturaleza dominios GGDEF que no presentan los aminoácidos conservados, sin embargo, estos dominios son incapaces de sintetizar c-di-GMP, y pueden tener funciones estructurales o regulatorias dentro de la célula²⁵³.

De manera similar a otras diguanilato ciclasas, también identificamos el motivo RxxD a una distancia de cinco aminoácidos *upstream* del motivo GGDEF de BdcB, correspondiente al sitio I. Esto nos sugiere que la actividad de esta enzima estaría regulada por un mecanismo del tipo *feedback* negativo, en el que el dímero de c-di-GMP intercalado se uniría a este motivo confiriéndole rigidez a la enzima e impidiendo así la síntesis de c-di-GMP.

A cerca del motivo *coiled coil* analizamos la composición de este motivo y determinamos que, así como en otras diguanilato ciclasas, este motivo contiene residuos hidrofóbicos, principalmente residuos de leucinas. La presencia de estos residuos de aminoácidos sería importante para establecer el dímero y transmitir la señal sensada por el dominio N-terminal al dominio GGDEF a través de cambios conformacionales. Estos cambios conformacionales permitirían posicionar los dominios GGDEF en alineación paralela para llevar a cabo la síntesis de c-di-GMP. Schirmer y otros autores postulan que probablemente no solo la composición del motivo *coiled coil* podría influir en la traducción de señales del

Capítulo 2

dominio sensor al dominio GGDEF, sino que también su largo podría permitir una fina regulación de la actividad de la enzima¹⁹⁷. Tal es el caso de la proteína WspR que presenta un motivo *coiled coil* con una longitud de 28 aminoácidos. Esta proteína no solo es capaz de dimerizar sino que forma tetrámeros, mientras que la presencia de hélices de longitud más corta (16 aminoácidos o menos), como en el caso de la diguanilato ciclasa de *Borrelia burgdorferi*, Rrp1, parecen establecer una regulación más sencilla, siendo capaz de formar solo dímeros. Sin embargo, se requerirá un estudio más exhaustivo del efecto de las variaciones de longitud y composición de la hélice en la señalización y cómo esto eventualmente se traduce en mecanismos moleculares de regulación para varios dominios efectores a fin de realizar predicciones racionales^{197,254}.

Para confirmar la posible actividad diguanilato ciclasa de BdcB llevamos a cabo una serie de experimentos *in vitro*. En primer lugar, realizamos una expresión heteróloga de *bdcB* en la cepa *PfΔ4DGC* que no forma *biofilm* en las condiciones ensayadas. En este caso pudimos ver que la sobreexpresión de BdcB revirtió el fenotipo no formador de *biofilm* de esta cepa. En un trabajo previo, realizado por nuestro grupo, hemos empleado esta herramienta para estudiar la actividad diguanilato ciclasa de BdcA. En este caso también vimos que la sobreexpresión de la diguanilato ciclasa BdcA de *B. bronchiseptica* es capaz de revertir este fenotipo no formador de *biofilm*. Seguidamente, medimos los niveles de c-di-GMP en *B. bronchiseptica* confirmando que la sobreexpresión de esta diguanilato ciclasa aumenta los niveles de c-di-GMP confirmando la actividad de la misma²³⁹, lo que nos afianza el resultado obtenido en el ensayo con la cepa *PfΔ4DGCpbdcB*. Adicionalmente, empleamos esta estrategia para analizar la importancia del sitio catalítico de BdcB y su región N-terminal. Para analizar el rol del sitio activo cambiamos el GGDEF por GGAAF. Esta sustitución de aminoácidos en el sitio activo ya ha sido empleada por nosotros y otros autores, como por ejemplo en el estudio de las diguanilato ciclasas GcbB y GcbC de *P. fluorescens*²⁵⁵, DgcC de *E. coli*²³⁶ y BdcA de *B. bronchiseptica*²³⁹. La sustitución de los aminoácidos del sitio activo en todos los casos impidió la síntesis de c-di-GMP. En el caso de BdcB, la mutación en el sitio activo de BdcB, no revirtió el fenotipo no formador de *biofilm* de la cepa *PfΔ4DGC*. Esto demuestra que la actividad diguanilato ciclasa sería importante para aumentar formación de *biofilm*.

Adicionalmente mediante ensayos de expresión heteróloga en *PfΔ4DGC* y de sobreexpresión en *B. bronchiseptica* determinamos que la región N-terminal podría ser importante para la actividad diguanilato ciclasa de esta enzima. Como se menciona anteriormente, una hipótesis es que esta región sea importante para el sensado de alguna señal y para la dimerización de la proteína. El grupo de Regina Hengge, quien realizó varios estudios exhaustivos de diguanilato ciclasas de *E. coli*, ha demostrado la importancia de las regiones N-terminales para la dimerización a través de ensayos de doble híbrido^{232,236}. De manera análoga a sus ensayos, empleamos esta estrategia para evaluar la dimerización de BdcB. Sin embargo, no logramos demostrar la dimerización mediante la técnica de doble híbrido. El resultado negativo en este de

Capítulo 2

experimentos no es extraño, aun entre proteínas que sí interaccionan. En ocasiones impedimentos estéricos de las fusiones construidas impiden una correcta disposición para interaccionar. Tampoco se puede descartar que el entorno heterólogo de *E. coli* no aporte las condiciones necesarias para la dimerización. Tampoco pudimos probar que la región N-terminal junto al motivo *coiled coil*, sin el dominio GGDEF, sean capaces de dimerizar. Esto podría deberse a que BdcB necesite de alguna proteína o componente específico de *B. bronchiseptica* para estabilizar la proteína, o no tenga la señal que la active en el entorno heterólogo de *E. coli* o que exista algún problema de expresión en esta bacteria.

En nuestro grupo de trabajo han descrito que el aumento de los niveles de c-di-GMP en *B. bronchiseptica*, al igual que otras bacterias, conduce a un aumento en la formación de *biofilm* y a una inhibición de la movilidad¹⁷¹. Cuando sobreexpresamos *bdcB* observamos una mayor formación de *biofilm* y una inhibición de la movilidad respecto de la cepa Bbpvacío. Además, una mutación en el sitio activo de BdcB no presentó diferencias respecto a la cepa control, lo que respalda la hipótesis de que BdcB es una diguanilato ciclasa activa. Es importante en este punto poner en consideración que el efecto de aumento de formación de *biofilm* o de inhibición de movilidad que se observa al sobreexpresar *bdcB* no implica que BdcB este específicamente implicada en la regulación de estos fenotipos sino que simplemente modifica los niveles globales de c-di-GMP y esto hace que se alteren los procesos en el que este segundo mensajero está implicado. El rol de BdcB en la formación de *biofilm* y en la movilidad en *B. bronchiseptica* serán analizados en el próximo capítulo.

Capítulo 3: Rol de BdcB en la movilidad y la formación de *biofilm* en *B. bronchiseptica*

Introducción

En este capítulo, después de haber analizado la actividad diguanilato ciclasa de BdcB, nos propusimos analizar su rol fisiológico. Para iniciar este estudio en primer lugar analizamos el rol de BdcB en la movilidad y la formación de *biofilm* de *B. bronchiseptica* ya que son dos fenotipos clásicamente regulados por c-di-GMP y particularmente estudiados por nuestro grupo en esta bacteria.

El estudio de la formación de *biofilm* resulta de particular importancia ya que es un fenotipo asociado con la capacidad de *B. bronchiseptica* de persistir durante períodos de tiempo prolongados en el tracto respiratorio de varios modelos animales (ratas, ratones y cerdos)²⁵⁶. La capacidad de formar *biofilm* de esta bacteria fue puesta en evidencia de manera casi simultánea en dos trabajos de investigación independientes, el trabajo de Yasuhiko Irie y colaboradores por un lado, y el de Meenu Misrha y colaboradores por otro^{169,170}. Ambos grupos demostraron que *B. bronchiseptica* es capaz de formar *biofilm* tanto en condiciones de cultivo estático como en agitación en una variedad de superficies abióticas, que incluyen PVC, poliestireno y vidrio. A su vez demostraron que la formación de *biofilm* está regulada por el sistema de dos componentes BvgAS. Irie y colaboradores mostraron que cuando la bacteria se encuentra en fase avirulenta es incapaz de formar *biofilm* y que la mayor formación se presenta en fase de virulencia intermedia¹⁷⁰. Por otro lado, Misrha y colaboradores observaron que la máxima formación de *biofilm* se produce en la fase virulenta y que la formación de *biofilm* en avirulenta es mínima¹⁶⁹. Seguidamente, la capacidad de formación de *biofilm* y los mecanismos de regulación fueron y están siendo estudiados por otros grupos de investigadores, incluido el nuestro.

Para llevar a cabo el estudio de BdcB tanto en la formación de *biofilm* como en la movilidad de la bacteria, construimos cepas con diferenciada expresión de *bdcB* y analizamos dichos fenotipos. Los ensayos de movilidad solo fueron analizados en fase avirulenta ya que el flagelo se expresa únicamente en esta fase²⁵⁷. La capacidad de formar *biofilm* la evaluamos en diferentes superficies y mediante diferentes estrategias. Debido a que la formación de *biofilm* en *B. bronchiseptica* está regulada por el sistema de dos componentes BvgAS, el aporte de BdcB en este fenotipo fue analizado en todas las fases de virulencia.

Análisis del rol de BdcB en la movilidad tipo *swimming*

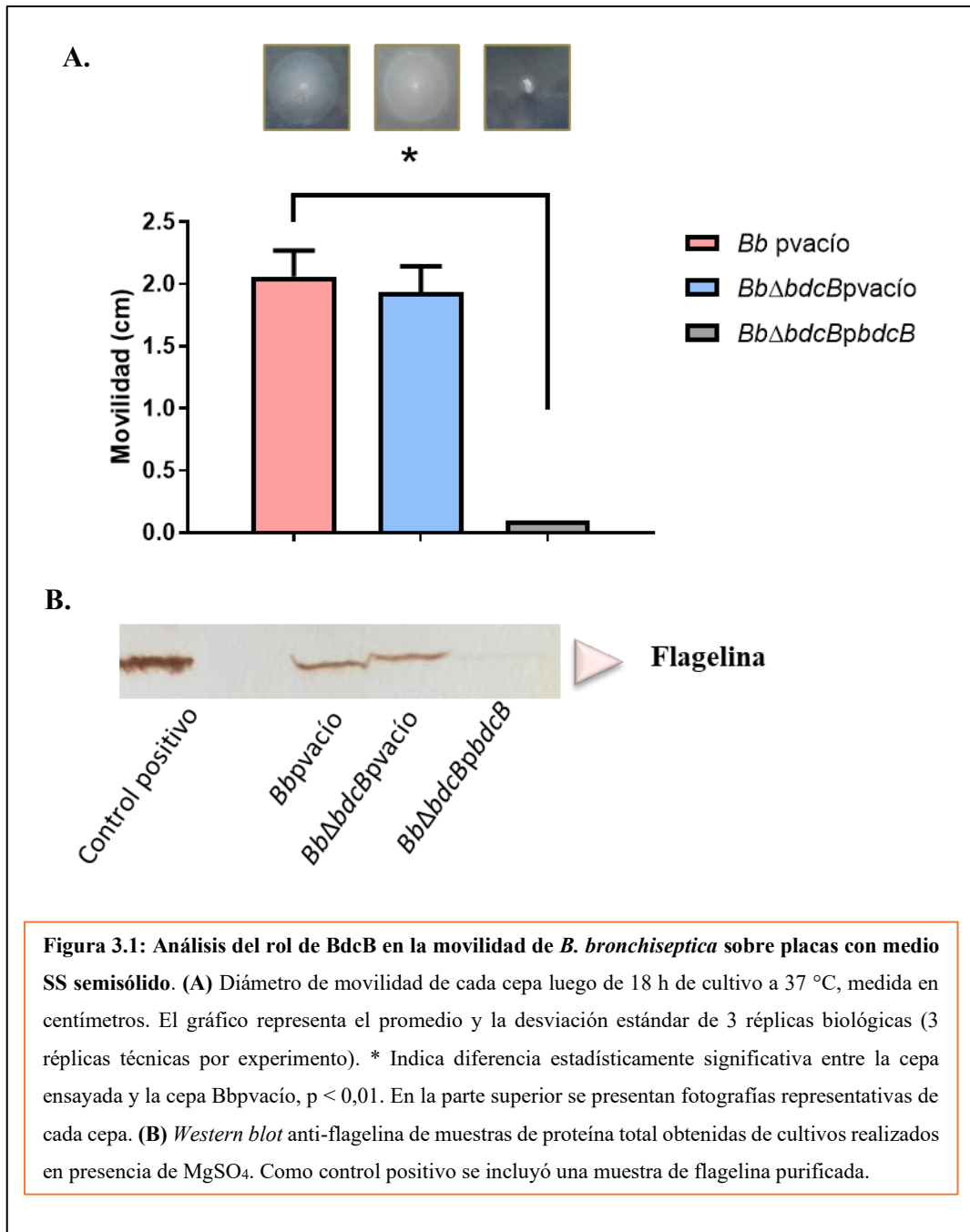
En *B. bronchiseptica* la síntesis del flagelo se encuentra regulada por el sistema de dos componentes BvgAS. Específicamente, el sistema regula la expresión del operón maestro *flhAB* que codifica para un activador de la transcripción de otros genes flagelares²⁵⁷. Cuando el sensor de membrana BvgS se encuentra activo (fase virulenta), BvgA está fosforilada y los genes implicados en la movilidad están reprimidos, mientras que cuando este sistema BvgAS está inactivo (fase avirulenta) estos genes se expresan y la bacteria es capaz de moverse²⁵⁸.

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado también que la señalización por c-di-GMP está implicada en la regulación de la movilidad en *B. bronchiseptica*. Incluso cuando el sistema BvgAS está inactivo, un aumento en los niveles de c-di-GMP, por ejemplo mediante la sobreexpresión de una diguanilato ciclasa, puede inhibir la movilidad y junto con ella la expresión de la flagelina^{171,239}.

A fin de determinar si BdcB está implicada en la regulación de este fenotipo construimos cepas con diferenciada expresión de *bdcB* y ensayamos su movilidad. En primer lugar, obtuvimos una cepa de *B. bronchiseptica* que presenta el gen *bdcB* interrumpido por un gen que otorga resistencia a kanamicina y la transformamos con el vector pBBR1-MCS5nptII sin inserto (Bb Δ *bdcB*pvacío). A modo de control utilizamos la cepa *B. bronchiseptica* transformada con el vector pBBR1-MCS5nptII (Bb Δ pvacío) y la cepa Bb Δ *bdcB* complementada con el gen de *bdcB* en el plásmido pBBR1-MCS5 bajo el control del promotor P_{nptII} (un promotor constitutivo y fuerte en *B. bronchiseptica*)²⁴⁹.

Una vez obtenidas todas las cepas procedimos a realizar el ensayo de movilidad propiamente dicho. Para estos ensayos empleamos medio SS semisólido (0,35% p/v de agar) suplementado con MgSO₄ 40 mM para inducir a la bacteria a la fase avirulenta.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación.



En la figura 3.1.A observamos que tanto la cepa *Bbp*vacío como la *BbΔbdcBp*vacío se mueven en la placa de agar semisólido formando halos concéntricos y el tamaño del diámetro del halo es similar en las dos cepas. Por otro lado, *BbΔbdcBp*bdcB es incapaz de moverse.

Como se mencionó anteriormente, el c-di-GMP puede inhibir la movilidad de la bacteria a través de la inhibición de la expresión del flagelo, o inhibiendo la rotación de éste. A fin de analizar cuál de los mecanismos se pone en juego en la inhibición de la movilidad en la cepa *BbΔbdcBp*bdcB, realizamos un *Western blot* con un suero policlonal que reconoce a la proteína flagelina, componente principal de la estructura flagelar.

Como se observa en la figura 3.1.B, no hubo diferencias en la síntesis de flagelina entre la cepa *Bbp*vacío y *BbΔbdcBp*vacío, mientras que la cepa *BbΔbdcBp*bdcB presenta una producción menor de flagelina. Como control utilizamos flagelina purificada.

En conclusión, si bien la delección de *bdcB* no afecta la movilidad de *B. bronchiseptica*, el aumento global de los niveles de c-di-GMP que produciría la sobreexpresión de BdcB inhiben la movilidad de la bacteria mediante la inhibición de la producción de flagelina.

Análisis del rol BdcB en la formación de *biofilm* en *B. bronchiseptica*

-Ensayos de formación de *biofilm* en microplacas de PVC

Otro fenotipo regulado por el c-di-GMP y que nuestro grupo ha iniciado su caracterización es la formación de *biofilm*. Con el objetivo de evaluar la participación de BdcB en la formación de *biofilm*, ensayamos la formación de *biofilm* de las cepas *Bbp*vacío, *BbΔbdcBp*vacío y *BbΔbdcBp*bdcB.

Debido a que la formación de *biofilm* en *B. bronchiseptica* está regulada por el sistema de dos componentes BvgAS, realizamos los ensayos en todas las fases de virulencia de la bacteria. En condiciones de laboratorio, el sistema BvgAS puede ser modulado por la adición de diferentes concentraciones milimolares de ácido nicotínico (AN) al medio de cultivo (Tabla 3.1)²⁵⁹.

<i>Fase de virulencia</i>	<i>Concentración Ácido Nicotínico (AN; mM)</i>
<i>Bvg</i> ⁺ (<i>virulenta</i>)	≤ 0,2
<i>Bvg</i> ⁱ (<i>intermedia</i>)	0,4 < AN > 1,6
<i>Bvg</i> ⁻ (<i>avirulenta</i>)	≥ 2,0

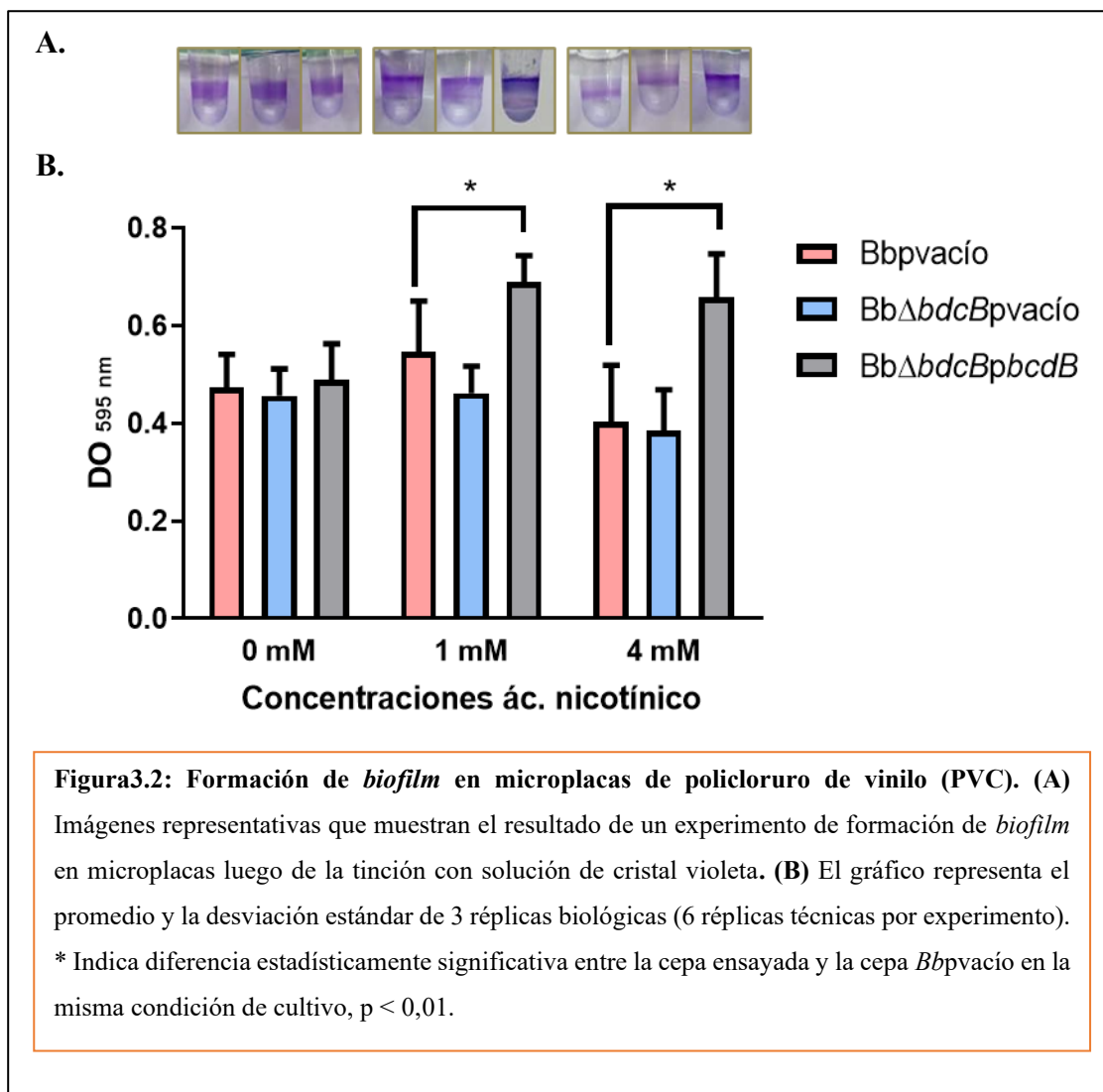
Tabla 3.1: Concentraciones de ácido nicotínico empleadas para inducir a *B. bronchiseptica* a las distintas fases de virulencia.

Para este ensayo en particular, se emplearon concentraciones 0 mM, 1,0 mM y 4,0 mM para inducir a la bacteria a fase virulenta, intermedia y avirulenta respectivamente. Es preciso destacar que el medio de

cultivo SS empleado para estos ensayos posee una concentración de ácido nicotínico de 0,032 μM que sin embargo no es suficiente para modular al sistema BvgAS.

Los cultivos bacterianos de $\text{DO}_{\text{inicial}}$ de 0,1 fueron inoculados en placas de PVC e incubados durante 24 horas a 37 °C en cámara húmeda. Transcurrido ese tiempo, los *biofilm* formados fueron teñidos y cuantificados mediante la técnica de tinción con cristal violeta.

Los resultados obtenidos se muestran en el siguiente gráfico (Figura 3.2).



La formación de *biofilm* de la cepa *Bbpvacío* la podemos apreciar en la región de la interfase de la suspensión bacteriana y el aire, donde se puede ver una coloración intensa de color violeta. Si bien esta característica la podemos observar en todas las condiciones de cultivo analizadas, la mayor intensidad y la máxima formación de *biofilm* la podemos ver en cultivos realizados con una concentración de 1,0 mM de

AN que, como mencionábamos anteriormente, corresponde a una fase de virulencia intermedia. Este resultado coincide con resultados publicados previamente por nuestro grupo y otros grupos que demuestran que la máxima formación de *biofilm* se produce en esta fase^{170,171}.

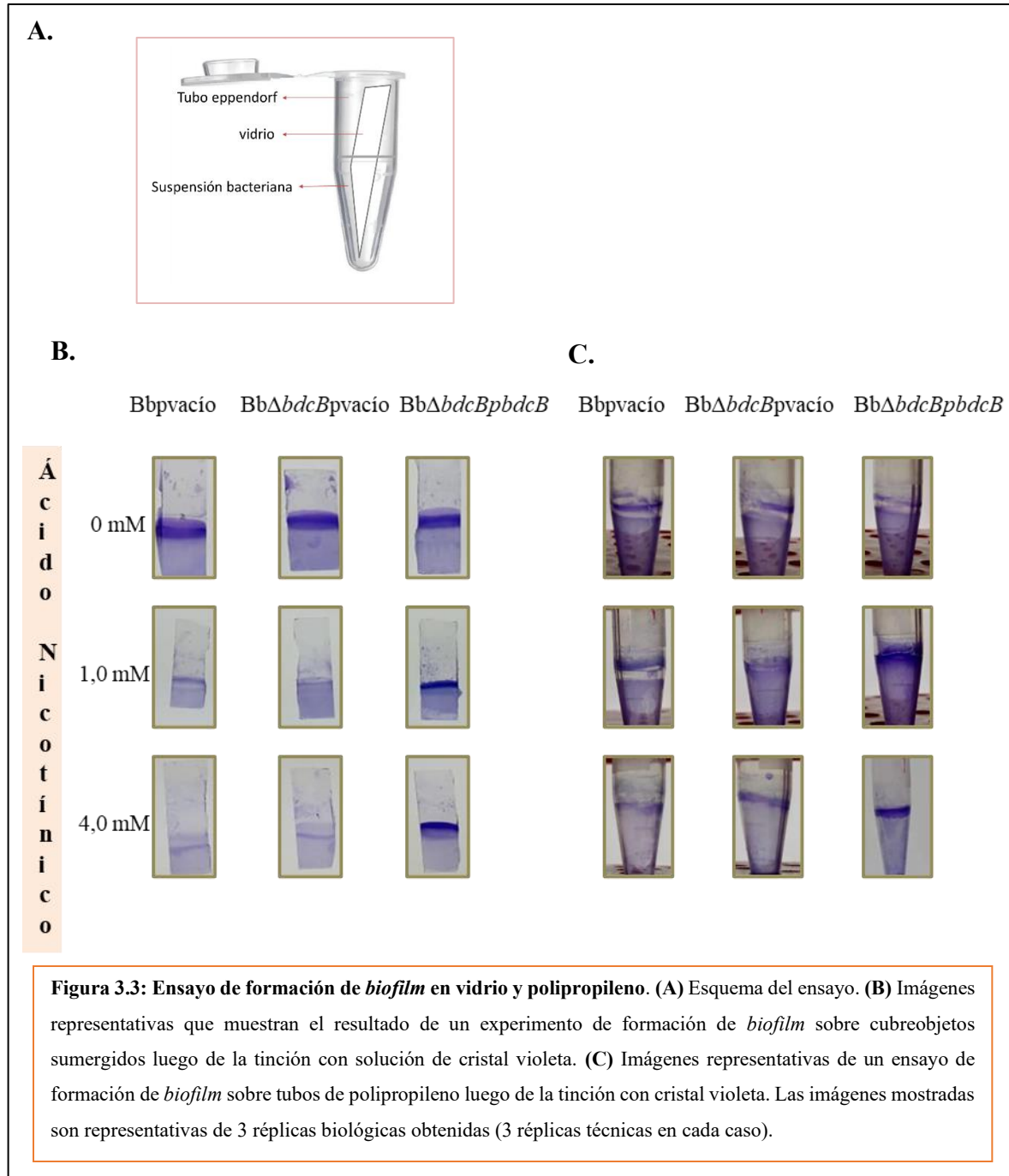
Respecto al comportamiento de la cepa *BbΔbdcBp*vacío observamos que la formación de *biofilm* es indistinguible respecto de la cepa *Bbp*vacío en todas las condiciones ensayadas.

Cuando comparamos la formación de *biofilm* de la cepa *BbΔbdcBpbdcB* respecto *Bbp*vacío vemos que en SS sin agregado de AN no presentan diferencias significativas, sin embargo, en concentraciones de AN de 1,0 mM y 4,0 mM la cepa *BbΔbdcBpbdcB* presenta una formación de *biofilm* significativamente mayor. Tal como proponíamos en el capítulo anterior, el aumento en la formación de *biofilm* en estas condiciones probablemente se deba a un aumento en los niveles de c-di-GMP globales dentro de la célula.

-Ensayos de formación de *biofilm* en vidrio y polipropileno

Se ha demostrado que la formación de *biofilm* es sensible a la superficie en la que se realice el ensayo^{169,170}. Además, en nuestro laboratorio hemos observado que en *Bordetella*, la formación de *biofilm* depende de la superficie que se emplee, probablemente debido a las diferentes hidrofobicidades de las superficies utilizadas (resultados no publicados). Con el fin de analizar si las cepas analizadas anteriormente (*Bbp*vacío, *BbΔbdcBp*vacío y *BbΔbdcBpbdcB*) presentan diferencias en la formación de *biofilm* al cambiar las superficies analizamos de manera cualitativa la formación de *biofilm* sobre vidrio y polipropileno.

Para estos ensayos, empleamos la misma suspensión bacteriana para ensayar las dos superficies. Los cultivos bacterianos preparados en medio SS con una $DO_{650nm}:0,1$ fueron colocados en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml de polipropileno. En estos cultivos se sumergió además un cubreobjetos cortado manualmente de manera tal que quede parcialmente sumergido en la suspensión bacteriana (Figura 3.3.A). Este sistema se incubó durante 24 horas a 37 °C. Pasado el tiempo de incubación, se fijaron los *biofilm* formados tanto en el vidrio como en el tubo de 1,5 ml con glutaraldehído 2,5 % v/v y posteriormente se empleó la técnica de tinción con cristal violeta para la tinción y visualización de los *biofilm*. Las imágenes representativas de los *biofilm* obtenidos, tanto en vidrio como en tubos de polipropileno, se muestran a continuación (Figura 3.3.B y 3.3.C).



Capítulo 3

En los *biofilm* formados sobre vidrio observamos que la cepa *Bbp*vacío en fase virulenta (0 mM AN) presenta una coloración intensa en la región del vidrio que se encontraba en la zona de la interfase aire-líquido y un espesor más grande respecto a las otras dos condiciones de AN ensayadas. Debajo de la región de la interfase se observa una coloración menos intensa. A 1,0 mM de AN, también se observa una región intensa en la interfase, mientras que a 4,0 mM la interfase no está bien definida y presenta una menor coloración. Cuando comparamos la cepa *BbΔbdcBp*vacío respecto a la cepa *Bbp*vacío observamos que la formación de *biofilm* en fase virulenta y avirulenta es similar en ambas cepas. Sin embargo, en fase intermedia (1,0 mM AN), la formación de *biofilm* de la cepa *BbΔbdcBp*vacío es menor a la de la cepa *Bbp*vacío. Esto se observa en el hecho de que *BbΔbdcBp*vacío no presenta una interfase aire-líquido bien definida y toda la región sumergida en contacto profundo con el medio de cultivo presenta la misma coloración.

Por otro lado, cuando comparamos la cepa *BbΔbdcBpbdcB* con la cepa control vemos que no presentan diferencias en la formación de *biofilm* en fase virulenta, mientras que en fase intermedia y avirulenta la región de la interfase de la cepa *BbΔbdcBpbdcB* presenta una coloración más intensa y bien definida.

Cuando analizamos la formación de *biofilm* en tubos de polipropileno observamos que la cepa *Bbp*vacío presenta una coloración intensa en la región se encontraba en la interfase aire-líquido tanto en fase virulenta e intermedia. Por el contrario, las regiones debajo de la interfase presentan una coloración más suave. Este resultado, sumado al descrito antes para la superficie de vidrio, pone en evidencia una preferencia de *B. bronchiseptica* por formar *biofilm* en la región cercana a la interfase aire-líquido. Cabe mencionar que *B. bronchiseptica* es un organismo aerobio obligado y posiblemente esta característica es la que haga que esta bacteria, en cultivos estáticos, tenga preferencia para formar *biofilm* en regiones del cultivo cercanas a la interfase aire-líquido las cuales presentan mayores niveles de concentración de oxígeno. En fase avirulenta, la coloración en la interfase también está bien definida, aunque de menor intensidad que el resto de las fases y la región inferior que estuvo en contacto con el medio de cultivo prácticamente no presenta coloración.

En estos ensayos también se repite que la cepa delecionada en *bdcB* solo presenta diferencias de comportamiento respecto de la cepa *Bbp*vacío en fase intermedia. Nuevamente, la cepa *BbΔbdcBp*vacío no presenta una interfase definida, sino que toda la superficie que estuvo en contacto con el medio de cultivo presenta la misma coloración.

Por último, cuando comparamos *Bbp*vacío con la cepa *BbΔbdcBpbdcB* vemos que, al igual que en vidrio, la formación de *biofilm* por parte de la cepa que sobreexpresa *bdcB* presenta una coloración más intensa principalmente en la región de la interfase en la fase intermedia y avirulenta.

En conclusión, si bien en los ensayos de formación de *biofilm* en placas multipocillos la cepa *BbΔbdcB*pvacío no presentó diferencias con respecto a la cepa *Bb*pvacío, la estructura del *biofilm* formado tanto en vidrio como en tubos de polipropileno sí presenta diferencias, con mayor dispersión de células a lo largo de la superficie a 1,0 mM de ácido nicotínico. Este resultado da cuenta que la contribución de BdcB a la formación de *biofilm* es dependiente de la naturaleza de la superficie y de la fase de virulencia en la que se encuentre la bacteria. Adicionalmente, la cepa *BbΔbdcBpbdcB*, presenta mayor formación de *biofilm* en fase intermedia y avirulenta en las distintas superficies ensayadas probablemente por aumentar los niveles de c-di-GMP, mientras que en fase virulenta fue incapaz de aumentar la formación de *biofilm*.

Con el objetivo de evaluar a nivel microscópico el rol de BdcB en la formación de *biofilm* sobre vidrio en la fase intermedia, que es la fase en la cual observamos diferencias, utilizamos la microscopía electrónica de barrido (SEM). Para esto, ensayamos la formación de *biofilm* de las cepas *Bb*pvacío, *BbΔbdcB*pvacío y *BbΔbdcBpbdcB* sobre vidrio en medio SS suplementado con 1,0 mM de AN durante 24 horas como en los ensayos anteriores. Las imágenes obtenidas empleando un aumento 3000X se muestran en la Figura 3.4.

En la figura se pueden ver las imágenes de los *biofilms* formados por las tres cepas ensayadas en la región del vidrio correspondiente a la interfase aire-líquido y la región inferior del vidrio que estuvo en contacto con las regiones más profundas del medio de cultivo. La cepa *Bb*pvacío presenta un *biofilm* estructurado con canales de líquido bien definidos sobre la interfase. Adicionalmente, en la región inferior, se pueden visualizar algunas bacterias adheridas. Al comparar estas imágenes con las obtenidas para *BbΔbdcB*pvacío, se puede ver que los *biofilms* formados por esta última cepa presentan una monocapa de células con poca estructuración. Por otro lado, si analizamos las zonas inferiores de los vidrios sumergido vemos una mayor cantidad de células adheridas. Este último resultado coincide con los resultados obtenidos con la técnica de tinción con cristal violeta que muestran que la cepa *BbΔbdcB*pvacío presenta una mayor coloración en la parte inferior del vidrio.

Por último, la cepa *BbΔbdcBpbdcB*, al igual que la cepa *Bb*pvacío, presenta un *biofilm* estructurado donde se pueden visualizar espacios entre las aglomeraciones de células dentro del *biofilm*. Sin embargo, la cepa *BbΔbdcBpbdcB* parece presentar cúmulos más grandes de células respecto de la cepa *Bb*pvacío.

En conclusión, Los resultados presentados en esta sección muestran nuevamente un rol destacado de la diguanilato ciclasa BdcB en la formación de *biofilm* de *B. bronchiseptica*.

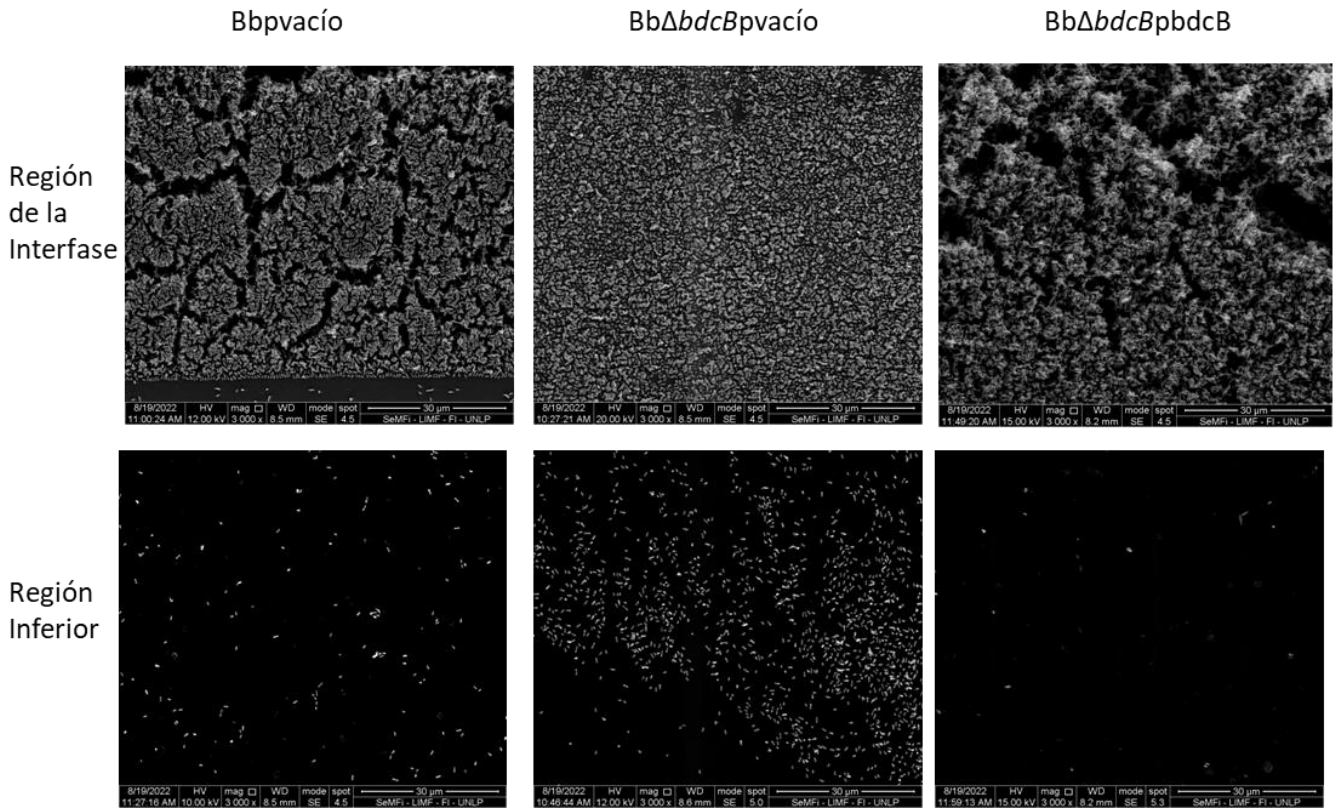


Figura 3.4: Análisis de la formación de *biofilm* en vidrio de las cepas *Bbpvació*, *BbΔbdcBpvació* y *BbΔbdcBpbdcB* en fase intermedia mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Los cultivos fueron incubados durante 24 horas a 37 °C sin agitación. Los paneles superiores muestran las regiones del vidrio que se encontraban en la zona de la interfase aire-líquido mientras que los paneles inferiores muestran zonas inferiores de los vidrio profundamente sumergidas en el medio de cultivo. Las imágenes corresponden a un aumento de 3000X.

Discusión

En este capítulo analizamos dos fenotipos en los cuales BdcB podría estar participando de forma específica dentro de la célula: movilidad y formación de *biofilm*. Ambos fenotipos están regulados por este sistema de señalización mediado por c-di-GMP tanto en *B. bronchiseptica* como en otras bacterias^{171,227,260}.

Los ensayos de movilidad los realizamos en presencia de 40 mM MgSO₄ para modular la bacteria a la fase avirulenta que es la fase en la cual el sistema BvgAS está inhibido y en consecuencia hay expresión del flagelo. En estos ensayos, la delección en *bdcB* no presentó diferencias respecto a la movilidad de la cepa *Bbpvacio*. Por lo tanto, BdcB no sería importante para la regulación de este fenotipo. La cepa *BbΔbdcBpbdcB* condujo a una marcada inhibición en la movilidad de la bacteria. Nuevamente este comportamiento podría atribuirse al aumento en los niveles de c-di-GMP, que como ya hemos reportado, inhiben la movilidad en *B. bronchiseptica*. Al analizar la expresión de la flagelina, pudimos ver que la inhibición de la movilidad de la cepa *BbΔbdcBpbdcB* se debe a una disminución en la expresión de flagelina aún en fase avirulenta donde la regulación mediada por el sistema BvgAS determinaría una máxima expresión de la misma. Este resultado nos estaría indicando que existe otro mecanismo, independiente del sistema BvgAS, que regula expresión de la flagelina, y que además este mecanismo sería regulado por los niveles de c-di-GMP. Este mismo resultado lo obtuvimos previamente al estudiar la diguanilato ciclasa BdcA²³⁹. Estos resultados sugieren que en *B. bronchiseptica* la regulación a través de c-di-GMP se impone sobre los mecanismos de regulación de BvgAS en el control de la movilidad. Hasta la fecha solo se ha descrito un mecanismo de regulación independiente al sistema BvgAS que estaría implicado en la activación de los genes de fase avirulenta, el sistema de dos componentes RisAS. El regulador de respuesta RisA es imprescindible para la activación de los genes regulados negativamente por BvgAS^{137,139,261}. El c-di-GMP podría estar regulando la activación de este regulador, mediante la regulación del estado de fosforilación de RisS o directamente mediante la unión del c-di-GMP a RisA. Podrían incluso existir otros factores transcripcionales a los que el c-di-GMP pueda unirse y no hayan sido descritos todavía. Otra posibilidad es que el c-di-GMP se esté uniendo a algún *riboswitch* e inhibiendo la expresión de los genes flagelares de manera post-transcriptional, tal como ha sido descrito en *V. cholerae* y en *C. difficile*^{262,263}.

En este capítulo también analizamos la participación de BdcB en la formación de *biofilm*. La formación de *biofilm* en *B. bronchiseptica* es un proceso secuencial en el que participan numerosas proteínas en las distintas etapas e intervienen diferentes sistemas de regulación. El primer sistema de regulación que ha sido descrito implicado en la regulación de este fenotipo en *Bordetella* es el sistema de dos componentes BvgAS^{169,170}. Varios grupos de investigación han demostrado que algunos factores de virulencia se encuentran implicados en este fenotipo (FHA, fimbria, CyaA) y que dependiendo de la fase de virulencia en la que se encuentre la bacteria cambia la capacidad de formar *biofilm*. Por lo tanto, a la

hora de analizar el rol de BdcB en la formación de *biofilm* fue necesario analizarlo en las diferentes fases de virulencia.

Como mencionamos en la introducción del capítulo, los autores que describieron el rol del sistema BvgAS en la formación de *biofilm* difieren en cuál es la fase en que *B. bronchiseptica* presenta mayor formación de *biofilm* al utilizar la cepa RB50 de *B. bronchiseptica*. Irie y colaboradores sugieren que la mayor formación se presenta en fase intermedia¹⁷⁰ mientras que, Misrha y colaboradores sugieren que la máxima formación de *biofilm* se produce en la fase virulenta¹⁶⁹. En nuestras manos, y con la cepa 9.73 H⁺ de *B. bronchiseptica*, la mayor formación de *biofilm* la observamos en fase intermedia y la bacteria es capaz de formar de *biofilm* tanto en fase virulenta como avirulenta tal como describió el trabajo de Irie. Las diferencias encontradas con el trabajo de Misrha podrían deberse a que tanto el grupo de Irie como nuestro grupo empleamos ácido nicotínico para modular al sistema BvgAS mientras que el grupo de Mishra emplearon diferentes mutantes en BvgS y BvgA. Además, cambios menores en el diseño experimental podrían haber contribuido a estas diferencias.

En el Capítulo 1 describimos y discutimos el aumento de la formación de *biofilm* en fase intermedia de la cepa que sobreexpresa *bdcB* respecto a la cepa *Bb*pvacío. Este aumento en la formación de *biofilm* también los observamos en los ensayos realizados en fase avirulenta. Sin embargo, la sobreexpresión de *bdcB* no produjo un aumento en la formación de *biofilm* en fase virulenta. Este resultado es sumamente interesante para nosotros ya que, en trabajos previos, cuando sobreexpresamos la diguanilato ciclasa BdcA, sí observamos un aumento en la formación de *biofilm* en las tres fases de virulencia¹⁷¹. En el caso de BdcB podría estar ocurriendo que esta enzima sea inhibida por alguna proteína de fase virulenta, o que requiera de otra proteína o factor para ser activa y que no esté presente en esta fase mientras que sí este presente en las otras fases.

Por otro lado, en nuestro laboratorio se ha descrito una adhesina, BrtA, cuya presencia en la membrana externa está regulada por c-di-GMP. Esta adhesina participa en la formación de *biofilm* solo en fase intermedia¹⁷⁵. Esto refuerza la idea de que la formación de *biofilm*, principalmente en fase intermedia, estaría regulada por c-di-GMP.

Al analizar el efecto de la delección de *bdcB* observamos que la capacidad de formar *biofilm* de la cepa *Bb* Δ *bdcB*pvacío en las placas multipocillos fue similar a la de la cepa *Bb*pvacío. Este resultado no resulta llamativo ya que debido a la redundancia de diguanilato ciclasas, es frecuente que la delección de una sola de ellas no sea suficiente para afectar la formación *biofilm*. Es el caso, por ejemplo, de *P. fluorescens*, en el que se necesita la delección de al menos de cuatro diguanilato ciclasas para abolir la formación de *biofilm*²⁴⁸. Alternativamente, la eliminación de una sola diguanilato ciclasa puede ser importante para la formación de *biofilm* dependiendo de la fuente de carbono utilizada²³³, lo que indicaría que BdcB podría participar en la formación de *biofilm* en condiciones aún no ensayadas.

Capítulo 3

Para avanzar con la descripción del rol de BdcB en la formación de *biofilm* decidimos evaluar este fenotipo sobre otro tipo de superficies. Al analizar la formación de *biofilm* en vidrio y en tubos de polipropileno observamos que en estas condiciones la cepa delecionada en *bdcB* sí presenta una menor formación de *biofilm* respecto de la cepa control en fase intermedia. Este resultado se visualizó mediante tinción con cristal violeta, y por microscopía de barrido. Ambos ensayos pusieron en evidencia un rol destacado de BdcB en la formación de *biofilm* de *B. bronchiseptica*.

Dado que la formación de *biofilm* es un proceso complejo que comprende múltiples etapas, la expresión de diferentes componentes y sistemas de regulación, sumado a que la regulación mediada por c-di-GMP puede intervenir en distintas instancias de este fenómeno resultan ser muchos los procesos a considerar en los que BdcB podría estar participando. Sería interesante seguir profundizando en un futuro el rol de BdcB en la regulación de diversos componentes del *biofilm* como la expresión de exopolisacáridos de la matriz y de adhesinas.

Como se describe en la introducción general, el fenotipo de formación de *biofilm* ha sido descrito como un fenotipo asociado a la colonización del huésped por parte de *B. bronchiseptica*. Con lo cual, el defecto en la formación de *biofilm* producido por la deleción de *bdcB* podría también estar ligado con algún defecto en la colonización. El fenotipo de la deleción de *bdcB* en el proceso de infección se analizará y discutirá en el capítulo 5.

Capítulo 4: Rol de BdcB en la sobrevivencia intracelular de *B. bronchiseptica*

Introducción

Una característica distintiva de la infección con *B. bronchiseptica* es su capacidad de permanecer en el huésped por períodos prolongados de tiempo. Uno de los mecanismos moleculares que les permitiría a estas bacterias protegerse frente a distintos efectores inmunes y establecer infecciones crónicas es su capacidad de sobrevivir intracelular. Se ha demostrado que *B. bronchiseptica* es capaz de sobrevivir dentro de células epiteliales, dendríticas y macrófagos¹⁵⁰⁻¹⁵³.

Para poder sobrevivir dentro de las células, las bacterias tienen que adaptarse al entorno desfavorable al que están sometidas. El pH ácido, la escasez de nutrientes y la generación de intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno son algunas de las amenazas a las que se enfrentan las bacterias al entrar en las células huésped. Sin embargo, los mecanismos que le permiten persistir dentro de las células siguen sin comprenderse en su totalidad.

La señalización mediada por c-di-GMP se ha asociado en diversas bacterias, no solo a la regulación de la formación de *biofilm*, sino también a fenotipos relacionados a la interacción con las células del sistema inmune: adherencia e invasión de la célula huésped, citotoxicidad, infección intracelular, secreción de factores de virulencia, resistencia al estrés oxidativo y modulación de la respuesta inmune²⁶⁴. Sin embargo, en *B. bronchiseptica* hay escasa bibliografía a cerca del rol de las enzimas implicadas en el metabolismo de c-di-GMP en estos fenotipos, a excepción de BvgR que ha sido descrito por varios autores por su relevancia como un componente del sistema BvgAS. Si bien BvgR presenta un dominio EAL, este no presenta los aminoácidos esenciales para formar un sitio activo capaz de degradar c-di-GMP, por lo que se cree que no tendría actividad fosfodiesterasa y su principal función sería la represión de genes por mecanismos aun no descritos²⁵⁸. En un estudio de proteómica comparativa entre bacterias de *B. pertussis* intracelular y extracelular, creciendo en el mismo medio de cultivo, se encontraron diferencialmente expresadas proteínas relacionadas con el metabolismo de c-di-GMP: BP1592, con dominios GGDEF-EAL, y BP1492, que contiene un dominio GGDEF. La expresión de ambos genes se encuentra aumentada en bacterias intracelulares, y permanece elevada incluso a las 48 horas post infección. Además, la expresión de la proteína BP1092, cuyo homólogo está presente también en *B. bronchiseptica* y que contiene los dominios GGDEF-EAL, aumenta significativamente en bacterias intracelulares a las 3 horas post infección y, entre todas las proteínas que aumentan su nivel de expresión en bacterias intracelulares, esta es la proteína con mayor aumento de expresión a las 48 horas post infección²⁶⁵. Si bien estos resultados demuestran que las enzimas implicadas en el metabolismo de c-di-GMP tienen un rol importante durante la vida intracelular de estas bacterias, hasta el día de hoy, no se ha profundizado en el estudio del rol de estas enzimas durante esta etapa del ciclo infeccioso de las bacterias del género *Bordetella*.

Capítulo 4

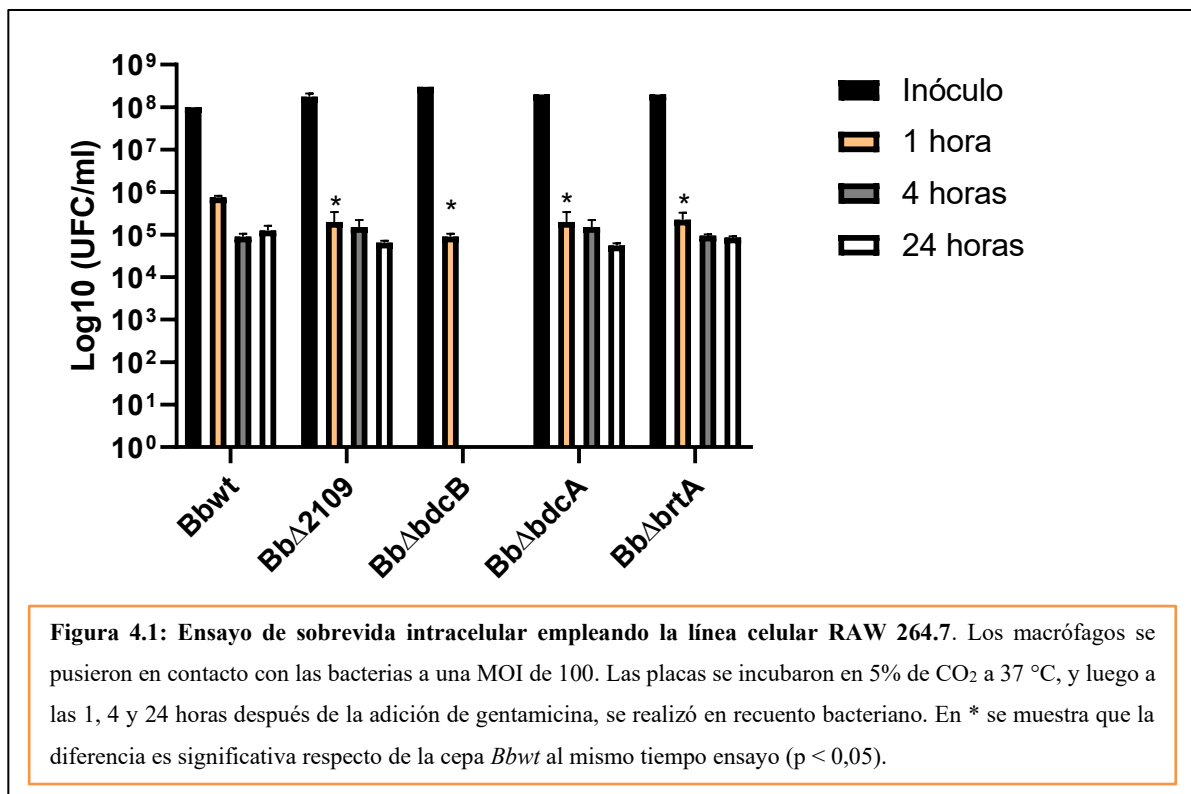
En este capítulo analizamos el rol de BdcB en la sobrevivida intracelular en macrófagos. Incluimos en estos análisis mutantes en otras enzimas implicadas en el sistema de señalización por c-di-GMP. Además, analizamos de qué manera BdcB podría estar vinculada con la vida intracelular de la bacteria mediante el análisis de la expresión de varios factores de virulencia, ensayos de resistencia a estrés oxidativo y estrés por pH.

Ensayo de sobrevivida intracelular en macrófagos Raw 264.7

Con el objetivo de iniciar el estudio del rol de BdcB en la vida intracelular realizamos un ensayo de sobrevivida intracelular empleando la línea de macrófagos inmortalizada Raw 264.7 comparando la cepa delecionada en *bdcB* con la cepa *Bbwt*.

A fin de evaluar si el efecto de *bdcB* es exclusivo de esta proteína en particular o si es general de las proteínas implicadas en el metabolismo de c-di-GMP incluimos como controles, a una mutante en el gen de otra diguanilato ciclasa: *bdcA*, un mutante en el gen de una fosfodiesterasa (BB2109), y un mutante en el gen de la adhesina BrtA cuya localización en la membrana de la bacteria depende de c-di-GMP¹⁷⁵. Para estos ensayos se empleó una multiplicidad de infección (MOI) de 100.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.1.



En la figura 4.1 se observa que *B. bronchiseptica* es capaz de sobrevivir dentro de los macrófagos durante 1, 2, 4 y 24 horas post-infección, tal como ha sido reportado previamente^{96,156}. Los mutantes *BbΔ2109*, *BbΔbdcA* y *BbΔbrtA* presentaron un recuento de UFC/ml un orden de magnitud menor que la cepa *wild type* en la primera hora post-inoculación, indicando una menor internalización, sin embargo, los recuentos realizados a las 4 horas y 24 horas no presentaron diferencias significativas respecto de la cepa *Bbwt*. Por otro lado, se observa que para la cepa *BbΔbdcB* en la primera hora post-infección se recuperaron menos bacterias en comparación con la cepa *Bbwt* y, a las 4 horas y 24 horas el recuento de bacterias estaba por debajo del límite de detección.

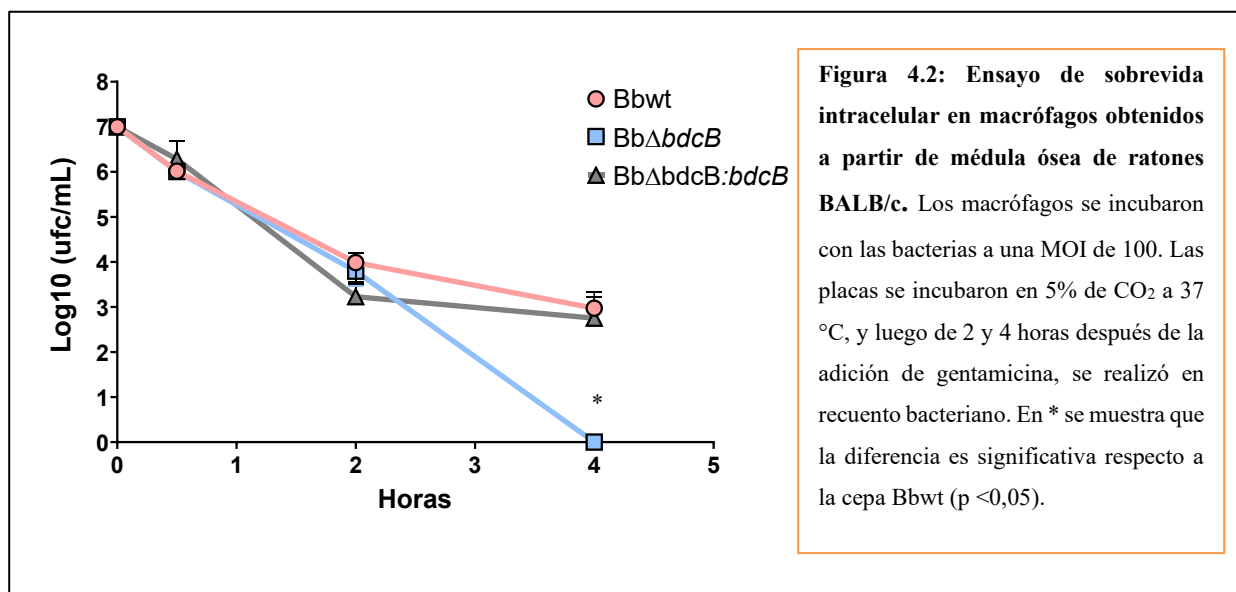
Este ensayo muestra entonces un papel importante y específico de BdcB en la vida intracelular de *B. bronchiseptica*. A partir de este resultado, consideramos importante seguir profundizando y buscar entender de qué manera esta proteína estaría participando en este fenotipo.

Dado que en el ensayo anterior estuvo planteado de manera de hacer un *screening* inicial, fue necesario repetir el ensayo de sobrevivencia intracelular de *BbΔbcdB* agregando como control a la cepa *BbΔbcdB* complementada (*BbΔbcdB:bdcB*) para confirmar que el fenotipo que vemos en la cepa *BbΔbcdB* se debe a la delección del gen *bdcB* y no a otra mutación inespecífica. Con este objetivo, revertimos la delección reintroduciendo una copia silvestre del gen *bdcB* con su propio promotor mediante doble recombinación homóloga en la misma posición original del genoma.

Se eligió esta estrategia en lugar de complementar en trans desde un plásmido ya que la sobreexpresión de *bdcB*, que codifica para una enzima, podría dar fenotipos diferentes a los presentes en la cepa salvaje y dificultar la interpretación de los resultados.

Una vez obtenida esta cepa, repetimos el ensayo de sobrevivencia intracelular, pero esta vez empleamos macrófagos derivados de médula ósea de ratones BALB/c. La estrategia experimental fue similar a la empleada en el ensayo anterior, a excepción que esta vez solo ensayamos el recuento bacteriano a las 2 y 4 horas post-infección.

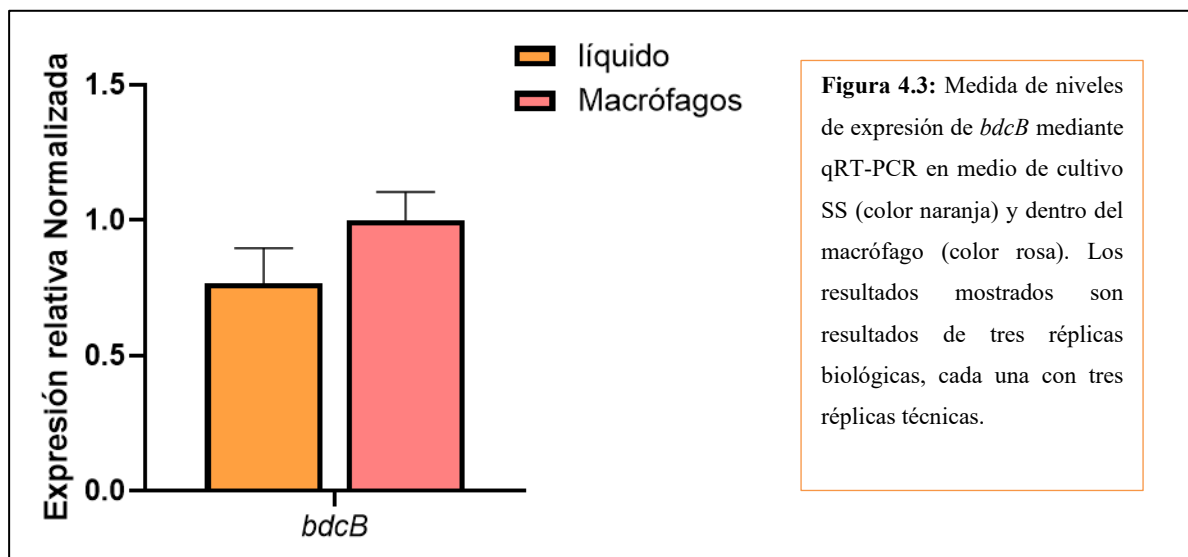
El resultado obtenido se muestra en la figura 4.2.



En este ensayo, nuevamente vemos que la cepa *Bbwt* es recuperada a las 2 y 4 horas post-infección, mientras que la cepa *BbΔbdcB* no es recuperada a las 4 horas post-infección. En cuanto a la cepa *BbΔbdcB:bdcB* vemos que no presenta diferencias con respecto a la cepa *Bbwt* indicando que la complementación del mutante con una copia silvestre de *bdcB* restituyó el fenotipo de la bacteria.

Análisis de expresión de *bdcB* dentro de macrófagos

Dado que BdcB tendría un rol importante en la sobrevivencia intracelular, hipotetizamos que la expresión de *bdcB* se activaría dentro de los macrófagos. Para analizar esto, realizamos un ensayo de qRT-PCR, empleando la cepa *Bbwt* para comparar el nivel de expresión de *bdcB* en medio SS líquido con los niveles de expresión de *bdcB* dentro de los macrófagos a las dos horas post-infección. El resultado se muestra en la figura 4.3.



Como se observa en la figura, no encontramos diferencias en los niveles de expresión de *bdcB* entre las dos condiciones ensayadas.

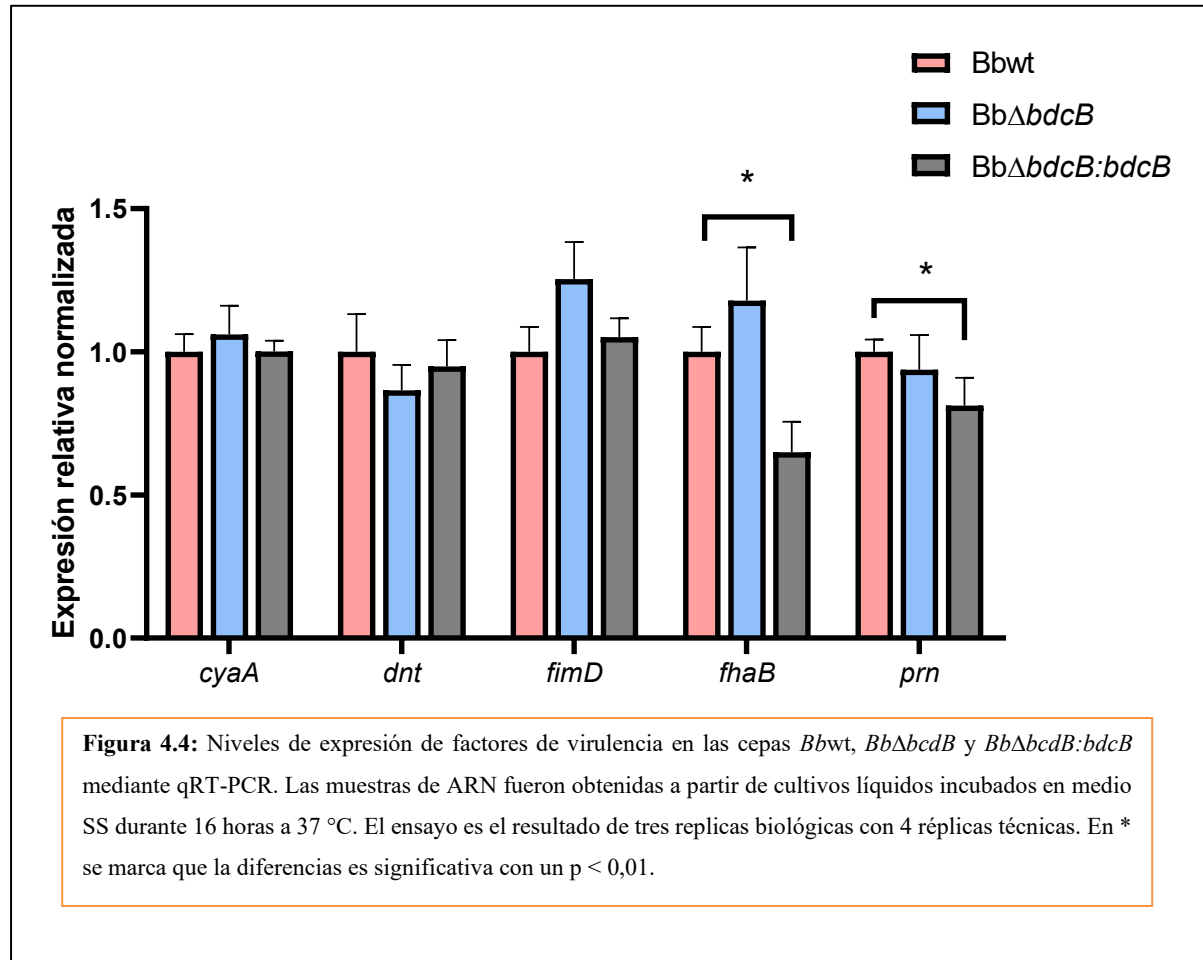
Caracterización de los factores de virulencia en *BbΔbcdB*

A fin de analizar de qué manera BdcB estaría participando en la supervivencia dentro del macrófago, analizamos la posibilidad de que la ausencia de *bdcB* este afectando la expresión de los factores de virulencia involucrados en este fenotipo.

El primer factor de virulencia que analizamos fue la adenilato ciclasa (*CyaA*). Esta proteína presenta su actividad adenilato ciclasa en el extremo N-terminal y en su región restante presenta un dominio hemolisina capaz de formar canales selectivos en las membranas de los eritrocitos desencadenando así su hemólisis^{97,98}. *CyaA* es capaz de inhibir funciones bactericidas como la capacidad fagocítica y la generación de especies reactivas de oxígeno de los macrófagos y puede desencadenar la apoptosis de los macrófagos *in vitro*^{96,97} e *in vivo*^{93-95,98}.

Experimentalmente, una forma de evaluar si *cyaA* se expresa es haciendo crecer a las bacterias en medio BGA con sangre de carnero. De esta manera, cuando la bacteria crece se forma un halo de hemólisis alrededor de la colonia producto de la actividad hemolisina. En todos los ensayos realizados, pudimos ver que las cepas con las que trabajamos (*Bbwt*, *BbΔbcdB* y *BbΔbcdB:bdcB*) producen esos halos de hemólisis alrededor de las colonias (resultados no mostrados). Además, cuantificamos la expresión de *cyaA* por qRT-PCR de *Bbwt*, *BbΔbcdB* y *BbΔbcdB:bdcB* a partir de ARN extraído de bacterias cultivadas en medio líquido

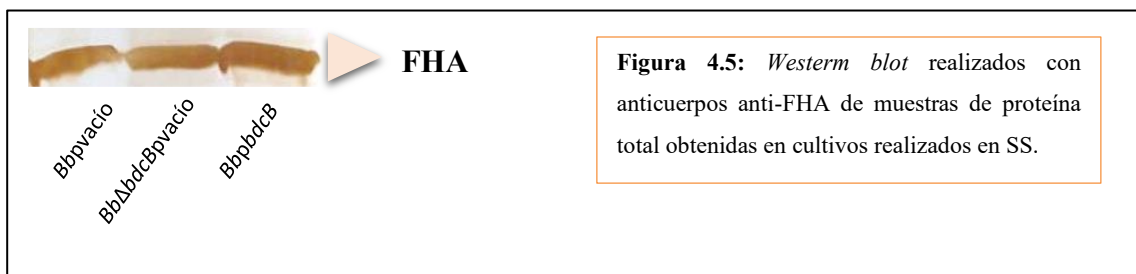
SS durante 16 horas. Los resultados se muestran en la figura 4.4 donde se puede ver que las cepas analizadas no presentan diferencias significativas respecto a la cepa *Bbwt*.



Otro factor de virulencia que analizamos fue la adhesina Hemaglutinina filamentosa (FHA), una adhesina que permite la adherencia a los macrófagos, y otras líneas celulares¹⁴⁶.

Para analizar niveles de expresión de esta adhesina, realizamos nuevamente ensayos de qRT-PCR de ARN obtenidos a partir de cultivos *overnight* en medio de cultivo SS de la cepa *Bbwt*, la cepa *BbΔbcdB* y la cepa *BbΔbcdB:bdcB*. En la figura 4.4 se puede ver que el nivel de expresión de *fhaB* en la cepa *BbΔbcdB* no presenta diferencias significativas respecto al de la cepa *Bbwt*, mientras que la cepa *BbΔbcdB:bdcB* presenta un nivel de expresión menor respecto de la cepa *Bbwt*.

Por otro lado, empleando las cepas *Bbp*vacío, *BbΔbcdB*pvacío y *BbpbdcB* realizamos *Western blot* con anticuerpos primarios anti-FHA. Sin embargo, no observamos diferencias en la producción de FHA en las tres cepas ensayadas (Figura 4.5).



Analizamos también por qRT-PCR los niveles expresión de otros factores de virulencia como la toxina dermonecrótica (*dnt*), pertactina (*prn*) y fimbria (*fimD*), los cuales también han sido reportados como importantes factores de virulencia. Sin embargo, no observamos diferencias significativas en los niveles de expresión de estos genes en la cepa *BbΔbcdB* respecto la cepa *Bbwt* (figura 4.4). Por otro lado, la cepa *BbΔbcdB:bdcB* no presentó diferencias significativas en los niveles de expresión de *dnt* y *fimD* pero presentó un nivel de expresión del gen *prn* significativamente menor comparado con la cepa *Bbwt*.

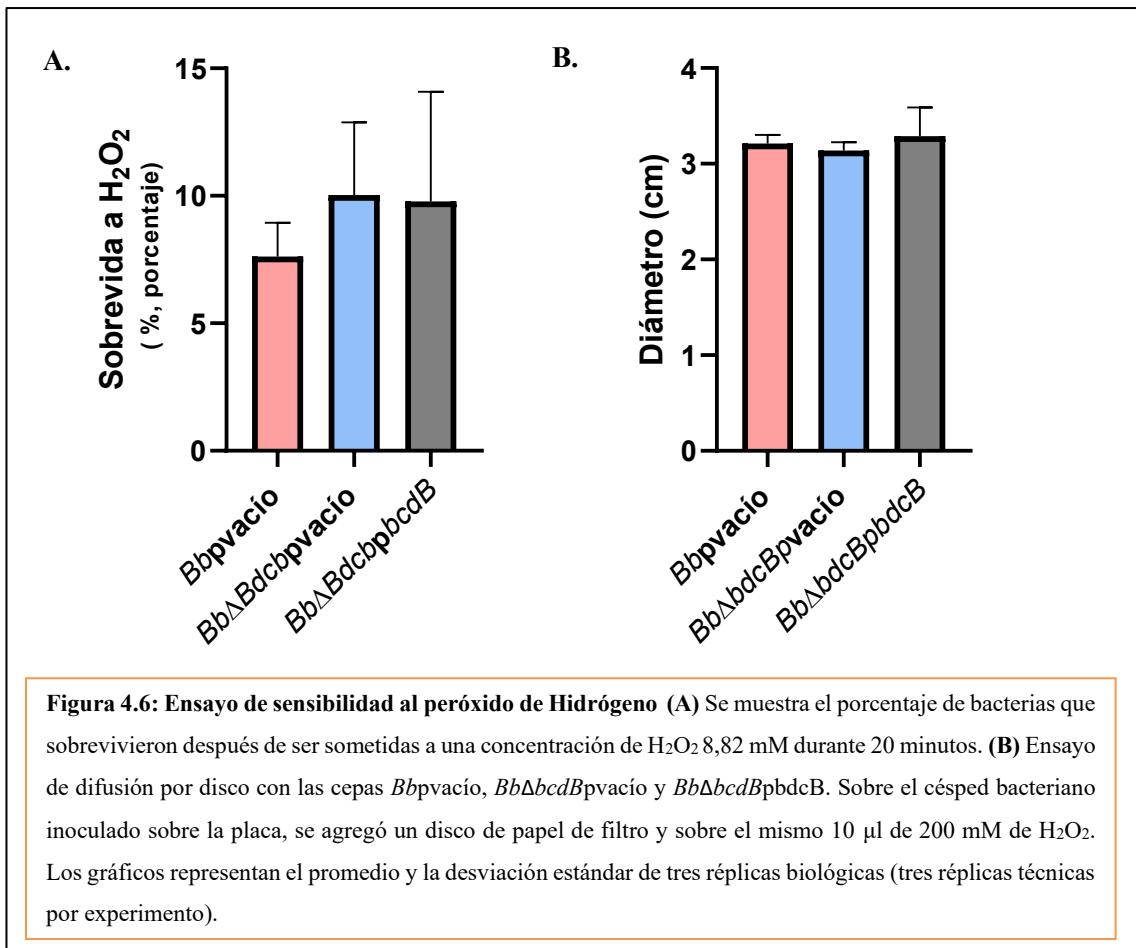
En conclusión, *BbΔbcdB* no presenta diferencias de expresión de los factores de virulencia analizados respecto a la cepa *Bbwt*. Por lo que no podemos asociar la incapacidad de la bacteria de sobrevivir dentro de los macrófagos a defectos en la expresión de estos factores de virulencia.

Análisis del rol de BdcB en la respuesta a estrés oxidativo y de pH

Resistencia de *BbΔbcdB* al peróxido de hidrógeno

Dado que dentro los macrófagos las bacterias son sometidas a mecanismos potencialmente bactericidas, como la generación y liberación de especies reactivas de oxígeno (radicales de superóxido y óxido nítrico), nos propusimos evaluar si BdcB presenta un rol en la respuesta a estrés oxidativo. Para ello realizamos un ensayo que consistió en someter a las bacterias (*Bbp*vacío, *BbΔbcdB*pvacío y *BbpbdcB*), a un estrés oxidativo de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) durante 20 minutos a 37 °C. Realizamos un recuento al inicio del ensayo (antes de agregar el H_2O_2) y otro al finalizar. Con el recuento inicial y final de cada una de las bacterias calculamos el porcentaje de bacterias vivas respecto del valor inicial, y a partir de estos valores realizamos el gráfico (Figura 4.6.A). Como se puede observar en la figura, solo el 10 % de bacterias sobrevive tras ser sometidas al H_2O_2 sin embargo, las tres cepas ensayadas presentan un porcentaje de sobrevivencia similar.

Otra estrategia que empleamos para analizar la sensibilidad al peróxido de hidrógeno de las distintas cepas fue la prueba de difusión por disco. La misma consiste en cultivar a las bacterias en medio sólido en presencia de un disco embebido con 10 µl de H₂O₂ 200 mM durante 24 horas. Finalizado el tiempo de incubación se midieron los halos de inhibición del crecimiento alrededor del disco. Los resultados se muestran en la figura 4.6.B donde se puede apreciar que los diámetros de los halos de inhibición de desarrollo son similares para las tres cepas ensayadas.



Crecimiento a pH ácido

Otro mecanismo bactericida al que pueden estar sometidas las bacterias dentro del macrófago es el pH ácido. Estudios transcriptómicos realizados con *B. bronchiseptica* han mostrado que varios genes expresados durante la supervivencia intracelular son similares a los expresados en respuesta a la exposición a un pH bajo (pH inferior a 4,0) después de una previa adaptación al ácido (pH =5,5)^{157,159}. Con lo cual, otra de las hipótesis por las cuales BdcB podría estar involucrada en la persistencia dentro de los macrófagos, es a través de la inducción de la resistencia al estrés por pH ácido.

Capítulo 4

A fin de evaluar esta hipótesis realizamos curvas de crecimiento de la cepa *BbΔbcdBp*vacío comparándola con la cepa control *Bbp*vacío, en distintas condiciones de acidez.

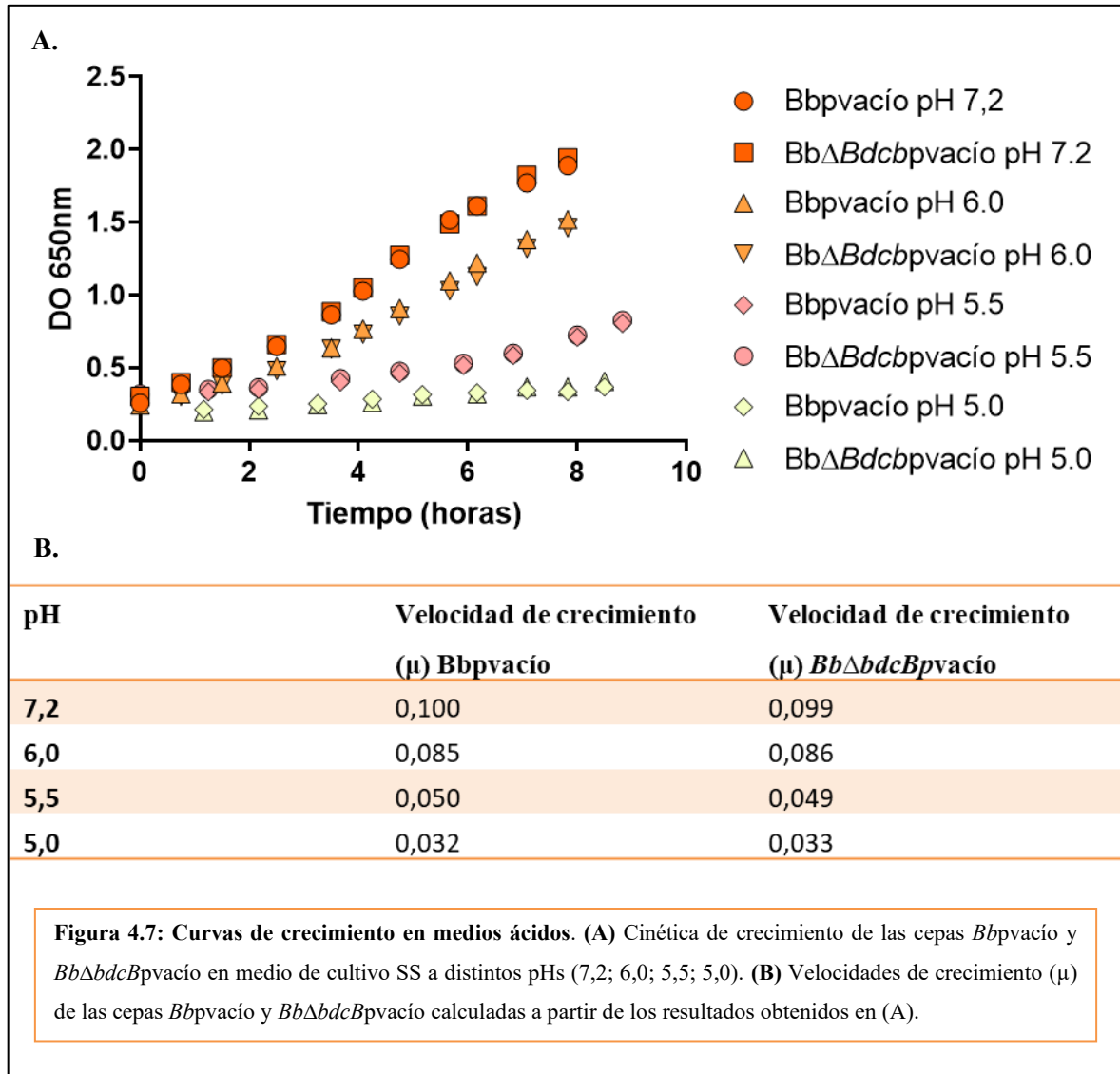
El pH óptimo de crecimiento de *B. bronchiseptica* es cercano a la neutralidad. El medio SS recomendado para su cultivo tiene un pH= 7,2. A medida que desciende el pH, la velocidad de crecimiento es menor, y presenta una velocidad de crecimiento mínima en un pH cercano a 4,5^{154,266}. En nuestros ensayos seleccionamos un pH levemente ácido cercano al óptimo (pH:6,0), un pH cercano al mínimo (pH= 5,0) y un pH intermedio entre estos dos (pH= 5,5), además de incluir como control el pH óptimo: 7,2.

Con el objetivo de trabajar en un sistema *Batch* manteniendo el pH prácticamente constante hasta el final del cultivo, realizamos modificaciones en la composición del medio SS original. En particular, cambiamos el tipo y la concentración de buffer empleado (Tabla 4.1)^{266,267}.

Medio de cultivo	Sustancia Buffer	Concentración (mM)	PH inicial del cultivo
SS original	Tris (pKa: 8.06, 25°C)	12,5	7,2
SS modificado	MES (pKa: 6.10, 25°C)	20,0	6,0 – 4,0

Tabla 4.1: Soluciones buffer empleadas para analizar el crecimiento a pH ácido

Además, a fin de minimizar la duración de la fase *lag* del crecimiento bacteriano partimos de un inóculo inicial con una concentración bacteriana de 6×10^8 bacterias/ml (equivalente a una DO_{650nm} de 0,250). Los ensayos fueron realizados en agitación a 37 °C. Las cinéticas de crecimiento bacteriano obtenidas para ambas cepas a los distintos pHs se muestran en la siguiente figura.



Tal como está reportado en la bibliografía, la cepa de *B. bronchiseptica* control (*Bbpvacío*) presenta la mayor velocidad de crecimiento a pH cercano a la neutralidad (pH= 7,2), mientras que a pH más ácidos su velocidad de crecimiento va disminuyendo, y a un pH= 5,0 prácticamente no se observa crecimiento. Cuando comparamos el comportamiento de *BbΔBdcBpvacío* con esta cepa control vemos que no hay diferencias en sus velocidades de crecimiento en los distintos pH analizados.

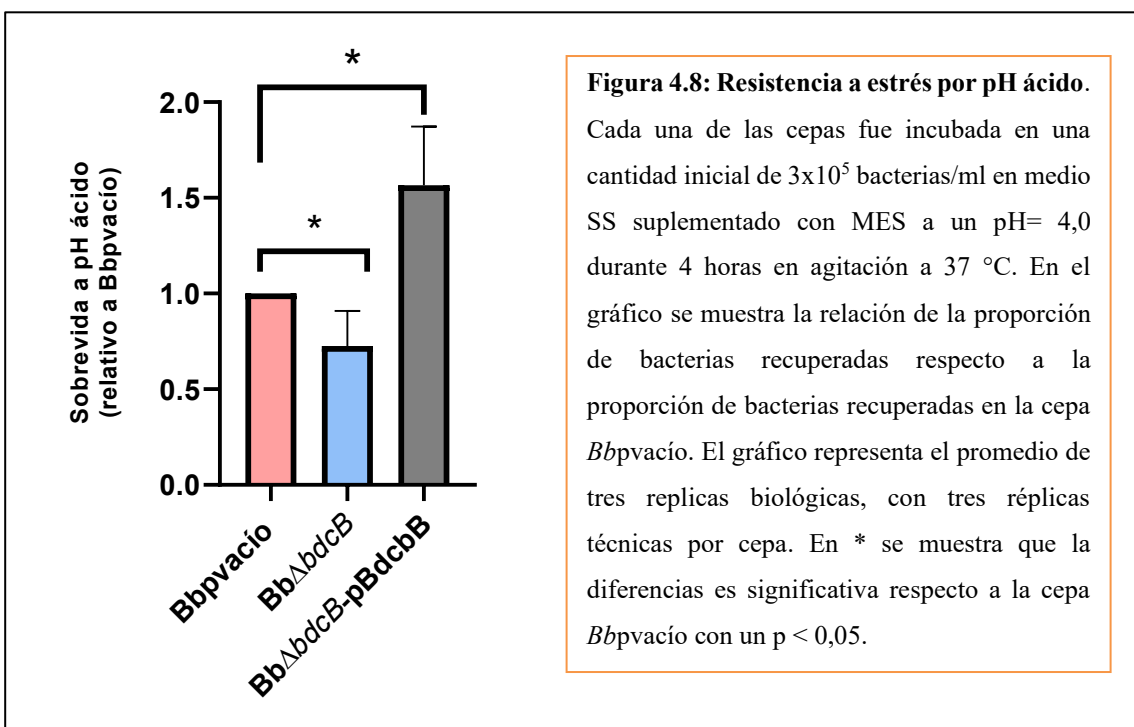
Ensayo de muerte a pH= 4

Por último, evaluamos qué sucede con estas cepas a un pH en el cual las bacterias no pueden sobrevivir.

Para llevar a cabo este análisis diseñamos un ensayo que consistió en someter a las bacterias a un pH ácido bactericida en medio SS y realizar el recuento de bacterias inicial y final. Sin embargo, antes de

realizar el ensayo propiamente dicho, hubo que definir y poner a punto una serie de parámetros como son el pH del medio de cultivo, el tiempo de incubación y el inóculo de bacterias iniciales. Esta puesta a punto es importante dado que a pHs muy bajos, tiempos muy largos o inóculos muy chicos la población bacteriana podría no resistir las condiciones haciéndose imposible apreciar diferencias entre las diferentes cepas. En el otro extremo, si las condiciones fueran no letales, permitirían que toda la población sobreviviera. Para ello se ensayaron tiempos (2 y 4 horas), dos pHs (pH= 4,5 y pH= 4,0) y dos inóculos (3×10^5 bacterias/ml y 3×10^8 bacterias/ml).

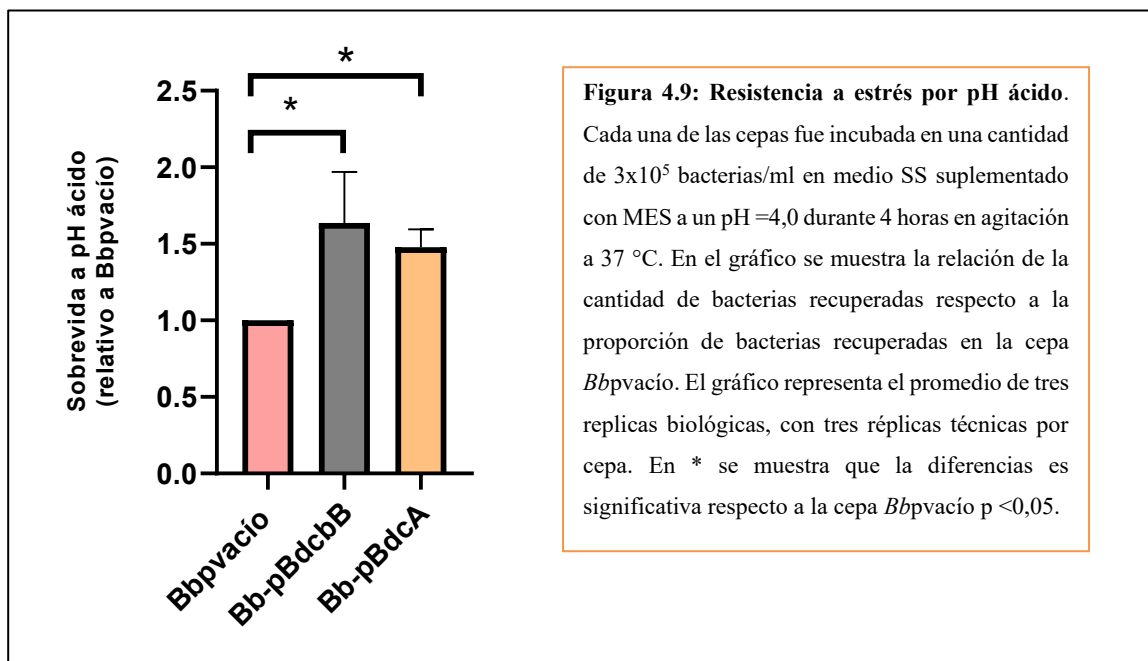
El ensayo final utilizado consistió en la incubación de un inóculo de 3×10^5 bacterias/ml en medio SS suplementado con MES a un pH =4,0 durante 4 horas en agitación a 37 °C. A partir del recuento inicial de bacterias (tiempo 0) y el recuento final (tiempo 4 horas) calculamos la fracción de bacterias vivas para cada cepa y lo normalizamos respecto al valor obtenido para la cepa *Bbpvacío*. El resultado obtenido tanto para la cepa *Bbpvacío*, *BbΔbcdB* y *BbΔbcdB-pBcdCB* se muestran en el siguiente gráfico (figura 4.8).



Como se observa en el gráfico, la proporción de bacterias recuperadas *BbΔbcdB* fue significativamente menor (un 25 %) respecto de la fracción de bacterias recuperadas de la cepa *Bbpvacío*. Es decir que hubo una mayor proporción de bacterias *BbΔbcdB* que se murieron en presencia del medio SS a pH= 4 respecto de la cepa *Bbpvacío*. En cambio, cuando complementamos la cepa *BbΔbcdB* con el plásmido que sobreexpresa *bcdB* la fracción de bacterias recuperadas fue 1,5 veces mayor que la recuperada en la cepa *Bbpvacío*.

El aumento en la sobrevivida de *BbΔbcdBpbdcB* podría deberse al incremento en los niveles de c-di-GMP, que por algún mecanismo aún desconocido mejore la sobrevivida en *B. bronchiseptica*. A fin de analizar si este aumento es específico en la sobreexpresión de *bdcB* o se debe al aumento en los niveles de c-di-GMP realizamos un ensayo evaluando la sobrevivida a pH= 4,0 de la cepa que sobreexpresa el gen de la diguanilato ciclasa *bdcA* (*BbpbdcA*), que es otra diguanilato ciclasa activa, capaz de aumentar los niveles de c-di-GMP²³⁹. Razonando que si el aumento en el porcentaje de sobrevivida de la cepa *BbpbdcB* se debe al aumento en los niveles de c-di-GMP, la cepa *BbpbdcA* también presentará el mismo comportamiento.

El resultado obtenido se muestra en la figura 4.9. Tanto *BbpbdcB* como *BbpbdcA* muestran una mayor proporción de bacterias recuperadas respecto de la cepa *Bbpbvacío* en las condiciones ensayadas.



Como resultado de estos ensayos podemos concluir que el aumento en los niveles de c-di-GMP inducido por la sobreexpresión de diguanilato ciclasas activas aumenta la capacidad de *B. bronchiseptica* de resistir al estrés por pH ácido, y en particular BdcB está involucrada en la respuesta a este tipo de estrés.

Discusión

En este capítulo evaluamos el rol de BdcB y otras proteínas implicadas en la señalización por c-di-GMP en la sobrevivencia intracelular de *B. bronchiseptica*. La acción reguladora de c-di-GMP es pleiotrópica y extremadamente diversa; abarca mecanismos transcripcionales, postranscripcionales y postraduccionales, e involucra a muchos componentes celulares. A lo largo de los años se han recopilado pruebas convincentes sobre el vínculo entre la señalización de c-di-GMP y la virulencia en diversas especies bacterianas¹⁹³. Sin embargo, aunque sabemos que este sistema de señalización está presente en *Bordetella spp*, no se ha descrito su rol en fenotipos relacionados con la patogénesis. En este sentido, si bien la proteína BvgR presenta un dominio EAL degenerado y su rol en la regulación de los factores de virulencia ha sido descrito en varios trabajos^{131,152}, no hay aún evidencias contundentes que permitan vincular a la mencionada BvgR con mecanismos de regulación dependientes de c-di-GMP. Con lo cual, este ensayo representa el comienzo del estudio del sistema de señalización por c-di-GMP en mecanismos relacionados con la vida de la bacteria en contacto con células del sistema inmune, como son los macrófagos.

Como se describe en este capítulo, en los ensayos de infección de macrófagos *in vitro* encontramos que los mutantes *BbΔ2109*, *BbΔbdcA*, *BbΔbrtA* y *BbΔbdcB* presentaron un recuento de UFC/ml menor en la primera hora post-infección respecto al de la cepa control. Esto podría deberse a una disminución en la capacidad de la bacteria de poder adherirse a las células eucariotas. BrtA es una adhesina que fue descrita por nuestro grupo de trabajo por tener un rol importante en la formación de *biofilm*. Para que BrtA puede estar anclada en la membrana de la bacteria se requiere que la proteína LapD una c-di-GMP y mantenga secuestrada en el periplasma a la proteasa LapG¹⁷⁵. Una de las diguanilato ciclasas implicada en suministrar el c-di-GMP a LapD es BdcA. Con lo cual, el fenotipo observado en el mutante *bdcA* puede deberse también a un defecto en la acumulación de BrtA en la membrana. Hemos demostrado también que BdcA requiere de BB2109 para ser activa, por lo que no podemos descartar que el efecto observado en el mutante *BbΔ2109* se deba también a un defecto en la localización de la adhesina BrtA²³⁹. La ausencia de BdcB mostró un comportamiento similar a estos mutantes una hora post-infección. Como vimos en el capítulo 2, la ausencia de BdcB también afectó la formación de *biofilm*, lo que podría indicar también que BdcB este participando en la regulación de alguna adhesina importante para estos dos fenotipos.

Por otro lado, la cepa *BbΔbdcB* fue la única que no pudo ser recuperada a partir de las cuatro horas post-infección. En este punto merecen ser consideradas dos posibilidades: (I) que el mutante este siendo fagocitado por los macrófagos y que por alguna razón la ausencia de BdcB impida la persistencia de la bacteria dentro del mismo, o (II) que *BbΔbdcB* presente una toxicidad aumentada e induzca la muerte de las células eucariotas. En este capítulo solo consideramos y analizamos la primera posibilidad, mientras que la segunda será evaluada en el próximo capítulo.

Independientemente de cuál sea el motivo por el cual *BbΔbdcB* no es recuperada en contacto con los macrófagos hay varios puntos que merecen ser discutidos. En primer lugar, de todas las cepas mutantes en diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas analizadas, la única en presentar este fenotipo fue la cepa *BbΔbdcB*. En el contexto del estudio de c-di-GMP, este resultado es sumamente interesante ya que dada la redundancia de las diguanilato ciclasas presentes en los genomas bacterianos suele ser difícil determinar fenotipos afectados por la delección de una en particular. Por ejemplo, en *Salmonella typhimurium* 10 de 20 enzimas implicadas en el metabolismo de c-di-GMP afectaron la capacidad de invadir células eucariotas y 6 de las 20 afectaron la inducción de IL-8 producida por las células epiteliales cuando son infectadas con *S. typhimurium*²⁶⁸. Otro ejemplo es el caso del patógeno oportunista *P. aeruginosa* en el que solo la delección de 1 de los 39 genes en diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas abolió completamente la virulencia de la bacteria mientras que 3 de estos genes redujeron parcialmente la virulencia²⁶⁹. Estos resultados dan cuenta de la importancia del hallazgo de la relación entre BdcB y la capacidad de *B. bronchiseptica* de sobrevivir a la infección en macrófagos.

Dado que identificamos un fenotipo específico en el que BdcB estaría participando, fue lógico suponer que la expresión de *bdcB* estaría aumentada en esta condición. Sin embargo, cuando comparamos los niveles de expresión de *bdcB* dentro del macrófago y fuera del mismo no observamos diferencias. Ensayos transcriptómicos de *B. bronchiseptica* RB50 dentro de macrófagos, usando la misma línea celular murina empleada por nosotros (RAW 264.7), tampoco mostraron un aumento a nivel transcripcional de este gen¹⁵⁹. Con lo cual se podría suponer que BdcB tiene algún tipo de regulación post-transcripcional que le permitiría activarse frente a una determinada condición o señal. Hasta la fecha se han descrito dos mecanismos de activación posibles (I) La diguanilato ciclasa podría estar formando un dímero inactivo en la que los dos dominios GGDEF requeridos para la síntesis de c-di-GMP no estén enfrentados o en la orientación correcta y frente al sensado de la señal cambien de conformación y se reorienten correctamente. Un ejemplo de este mecanismo de regulación se observa en la diguanilato ciclasa DosC de *E. coli* que se compone de tres dominios consecutivos (GLOBIN-MID (dominio medio)-GGDEF). Frente al sensado de oxígeno por parte del dominio GLOBIN se producen rearrreglos dentro del dímero que definen el estado activo de la enzima²⁷⁰. El segundo mecanismo de activación descrito (II) consiste en la dimerización de los monómeros frente al sensado de la señal. Es el caso de la diguanilato ciclasa WspR que en su forma inactiva se encuentra como monómero, y frente a la fosforilación de su dominio REC se induce su dimerización para establecer el estado catalíticamente activo¹⁹⁷.

A fin de dilucidar el mecanismo por el cual BdcB contribuye a aumentar la capacidad de supervivencia intracelular de *B. bronchiseptica* analizamos la expresión de varios factores de virulencia, sin embargo, no observamos diferencias de expresión de estos factores entre *BbΔbcdB* y la cepa silvestre. Dado que dentro de los macrófagos las bacterias están sometidas a distintos tipos de estreses, analizamos el rol de BdcB en

la resistencia de *B. bronchiseptica* al estrés por H₂O₂. Sin embargo, tampoco encontramos diferencias en el comportamiento de la cepa mutante comparado con la cepa silvestre.

En la última parte del trabajo nos enfocamos en estudiar el rol de BdcB en la capacidad de *B. bronchiseptica* de resistir a pHs ácidos. La tolerancia al estrés ácido parece ser fundamental para la supervivencia intracelular de *B. bronchiseptica*¹⁵⁴. Se ha demostrado que este patógeno puede persistir dentro de las células huésped, incluso en los fagosomas que se acidifican hasta un pH de 4,5 a 5,0 después de la infección bacteriana¹⁵⁴. Ensayos *in vitro* presentados aquí y por otros autores concuerdan con que la viabilidad de las bacterias *B. bronchiseptica* en fase virulenta no disminuye significativamente cuando se cultivan a pH tan bajo como 4,5, pero se ve afectada cuando el pH del medio es igual o menor a 4,0²⁶⁶.

Al analizar la cepa delecionada en *bdcB* pudimos ver que su viabilidad no se vio afectada en condiciones ácidas no letales, pero sí presentó una sobrevida menor cuando fue expuesta a un pH letal (pH= 4,0) respecto de la cepa silvestre. En un trabajo realizado por Fingerhann y Hozbor, muestran que *B. bronchiseptica* 9.73 H⁺ presenta un aumento en la viabilidad a pH letal cuando las bacterias son expuestas previamente a un pH subletal, fenómeno conocido como respuesta de tolerancia al ácido (ATR)^{266,271}. La exposición previa a condiciones ácidas intermedias provoca cambios en esta bacteria que inducen su resistencia a la exposición a condiciones extremadamente ácidas que de otro modo serían letales. Este fenómeno se correlacionó, al igual que en otros microorganismos como *E. coli*, *S. typhimurium* y *Streptococcus faecalis*, con cambios en los componentes asociados a la membrana y a la superficie bacteriana^{271,272}, indicando con esto que la composición de la membrana es importante para favorecer la sobrevida de la bacteria en condiciones de estrés ácido. Por ejemplo, detectaron cambios en el LPS de *B. bronchiseptica*²⁶⁶. El LPS extraído de bacterias cultivadas en condiciones ácidas mostró una mayor proporción de banda B (compuesta por el lípido A y core oligosacárido) y una menor cantidad de antígeno O que a pH neutro. Además, el pH ácido indujo la producción de la proteasa DegP que permite el procesamiento y la maduración de la adhesina FHA⁵⁴, como así también se indujeron varias chaperonas periplasmáticas que podrían favorecer el plegamiento de proteínas desnaturalizadas²⁷³. Con lo cual, podríamos inferir que el defecto en la sobrevida a pH ácido del mutante en *bdcB* podría deberse a algún defecto en la membrana, ya sea por un defecto en la expresión de genes relacionados con LPS o cambios en su composición, defectos en la expresión de otro polisacárido, o defectos en expresión o localización de alguna adhesina, entre otros. El defecto en alguno de estos componentes podría explicar también el defecto del mutante en *bdcB* en la capacidad de esta bacteria en la formación de *biofilm*.

Adicionalmente, la sobreexpresión de *bdcB* condujo a un aumento en la resistencia a pH ácido. A fin de determinar si este aumento era específico de BdcB o si era producto de un aumento en los niveles de c-di-GMP, analizamos el efecto de la sobreexpresión de BdcA. En este caso, también pudimos ver que su sobreexpresión aumentó la resistencia de la bacteria a pH ácido letal. Con lo cual podemos suponer que el

Capítulo 4

c-di-GMP está involucrado en mecanismos que le permiten a la bacteria resistir a estrés ácido. Como mencionamos anteriormente, este comportamiento puede explicarse por modificaciones en la composición y en la integridad de la membrana bacteriana mediadas por proteínas asociadas a la homeostasis del c-di-GMP.

Capítulo 5: Rol de BdcB en la citotoxicidad de *B. bronchiseptica*

Introducción

Como hemos descrito previamente, el c-di-GMP y las enzimas implicadas en su metabolismo participan en la regulación de fenotipos asociados a la interacción con las células del sistema inmune. En el capítulo anterior analizamos el rol de BdcB en la interacción de *B. bronchiseptica* con los macrófagos y encontramos que BdcB es un factor necesario para garantizar la sobrevivencia durante el proceso de infección.

En este capítulo analizamos el aporte de BdcB a la citotoxicidad de *B. bronchiseptica* sobre los macrófagos.

La regulación de la concentración de c-di-GMP se ha asociado a la virulencia en diversas bacterias. Por ejemplo, se ha visto que la citotoxicidad de *Burkholderia pseudomallei* sobre las células THP-1 de macrófagos humanos se redujo seis veces en ausencia de la fosfodiesterasa CdpA²⁷⁴. Las cepas de *Legionella pneumophila* que sobreexpresan la diguanilato ciclasa CdgS fueron menos citotóxicas para los macrófagos THP-1²⁷⁵. En *P. aeruginosa* la delección de *pvrR*, que codifica una supuesta fosfodiesterasa, o *fimX*, que codifica una proteína con dominios GGDEF y EAL degenerados, produjeron una reducción en la citotoxicidad sobre células CHO²⁶⁹.

En este capítulo analizamos el rol de BdcB en la citotoxicidad de *B. bronchiseptica* mediante dos técnicas diferentes. En primer lugar, cuantificamos la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa al sobrenadante de cultivo de macrófagos infectados con *B. bronchiseptica* silvestre y cepas que presentan diferentes niveles de expresión de *bdcB*. En segundo lugar, medimos la muerte celular de los macrófagos infectados mediante un ensayo con yoduro de propidio.

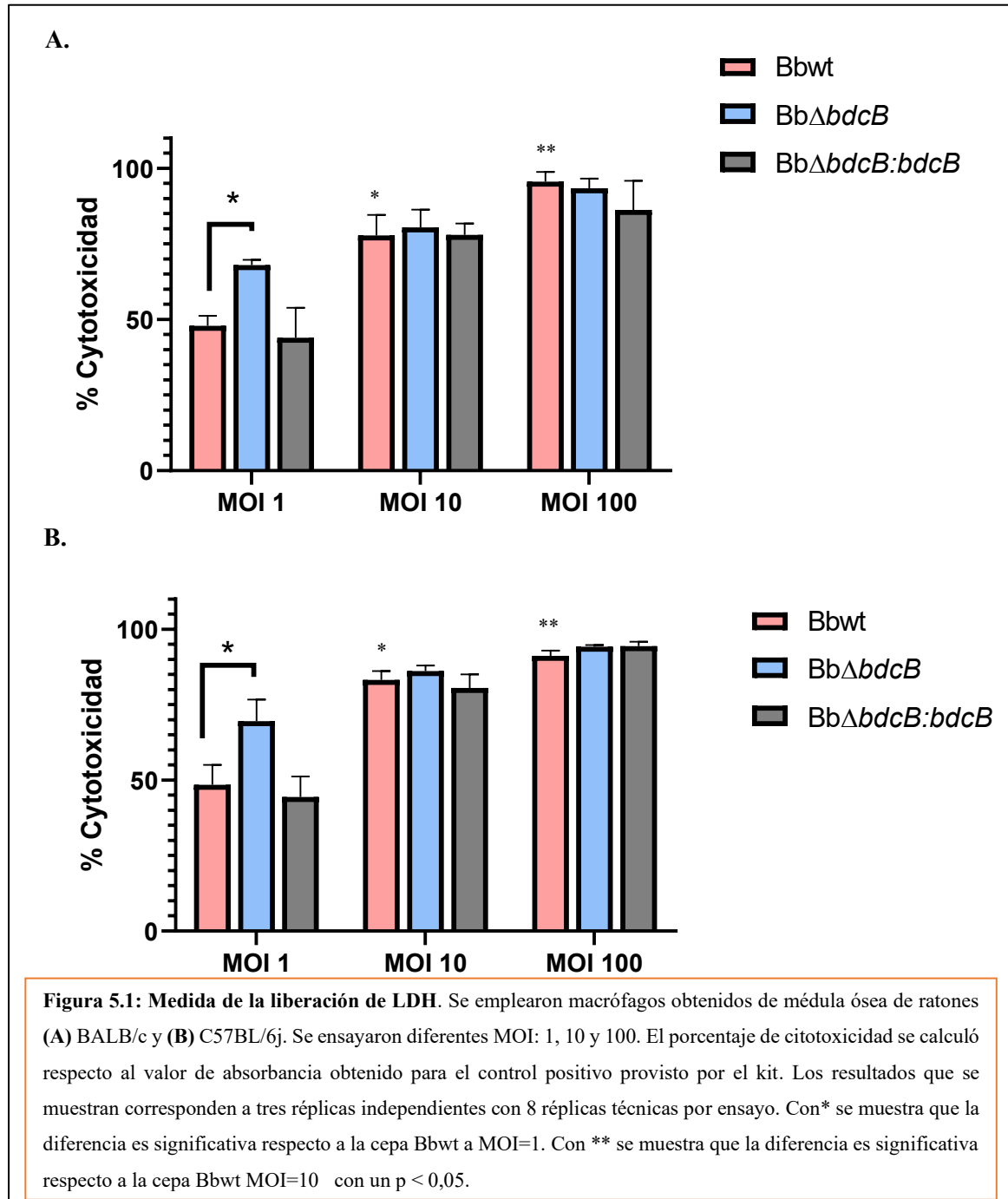
Teniendo en cuenta que en *B. bronchiseptica* el SST3 juega un rol importante en la capacidad citotóxica de esta bacteria, analizamos la expresión de algunos componentes de este sistema en la cepa *BbΔbdcB*. Por último, con el fin de analizar si BdcB tiene efecto sobre la respuesta inmune producida por los macrófagos infectados con *B. bronchiseptica*, analizamos la producción de citoquinas en sobrenadantes de cultivo de las células infectadas con las cepas *Bbwt*, *BbΔbdcB* y *BbΔbdcB:bdcB*.

Estudio del rol de BdcB en la citotoxicidad de *B. bronchiseptica* sobre macrófagos

En el capítulo anterior observamos que la cepa delecionada en *bdcB* no es recuperada de los macrófagos a las 4 horas post-infección. A fin de continuar analizando de qué manera BdcB podría estar afectando la fagocitosis de *B. bronchiseptica* realizamos una medida de citotoxicidad generada por la bacteria en contacto con los macrófagos a través de un ensayo de liberación de la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH) empleando un kit comercial. Esta enzima se libera al medio de cultivo solo cuando la célula está lisada; con lo cual, su medición da un valor cuantitativo de la pérdida de la viabilidad celular.

Para llevar a cabo este ensayo utilizamos cultivos primarios de macrófagos obtenidos de médula ósea de ratones BALB/c y C57BL/6j y los infectamos con las cepas *Bbwt*, *BbΔbdcB* y *BbΔbdcB:bdcB*

empleando multiplicidades de infección (MOI) de 1, 10 y 100. Transcurridas 4 horas post-infección separamos los sobrenadantes y realizamos la cuantificación de actividad LDH sobre los mismos. Los resultados se muestran en la figura 5.1.



Al analizar los porcentajes de citotoxicidad de la cepa *Bbwt* vemos que a medida que aumenta la multiplicidad de infección aumenta el porcentaje de citotoxicidad tanto en la infección con macrófagos

Capítulo 5

obtenidos de médula ósea de ratones BALB/c (figura 5.1.A) como de los obtenidos de ratones C57BL/6j (figura 5.1.B). Esta dependencia del porcentaje de citotoxicidad con la multiplicidad de infección en *B. bronchiseptica* ya ha sido descrita por varios autores^{150,155,267}. Por otro lado, cuando comparamos la citotoxicidad de la cepa *BbΔbdcB* con las cepas control vemos que a una MOI= 1 la citotoxicidad de la cepa *BbΔbdcB* es significativamente mayor tanto en los ensayos realizados con macrófagos BALB/c como con macrófagos obtenidos de ratones C57BL/6j. Mientras que a MOI= 10 y MOI= 100 no se observan diferencias significativas entre estas dos cepas ensayadas. Por otro lado, la cepa complementada *BbΔbdcB:bdcB* presenta un comportamiento similar a la cepa *Bbwt* en todas las MOI ensayas.

Con el fin de confirmar los resultados anteriores, evaluamos la citotoxicidad de las bacterias mediante un ensayo de infección en presencia de Ioduro de Propidio (IP). El IP es un compuesto fluorogénico que se une estequiométricamente a los ácidos nucleicos, pero es incapaz de atravesar las membranas de las células, por lo que solo se une al ADN de células muertas. Con lo cual, la intensidad de la fluorescencia observada en presencia de este compuesto es proporcional al daño celular.

Para esta evaluación incubamos a las bacterias con los macrófagos en un medio con IP y medimos la fluorescencia en función del tiempo. Así como en los ensayos de LDH, estos ensayos fueron realizados empleando macrófagos obtenidos a partir de médula ósea de ratones BALB/c y C57BL/6j y analizamos diferentes MOI (MOI 1, 10 y 100). Como control positivo incubamos a los macrófagos con Tritón-X 100, un detergente que lisa a los macrófagos, y como control negativo incubamos a los macrófagos con el medio de cultivo con IP.

En la figura 5.2 se muestran los resultados obtenidos para los ensayos realizados a MOI= 1 con macrófagos BALB/c (figura 5.2.A y 5.2.B) y C57BL/6j (figura 5.2.C y 5.2.D)

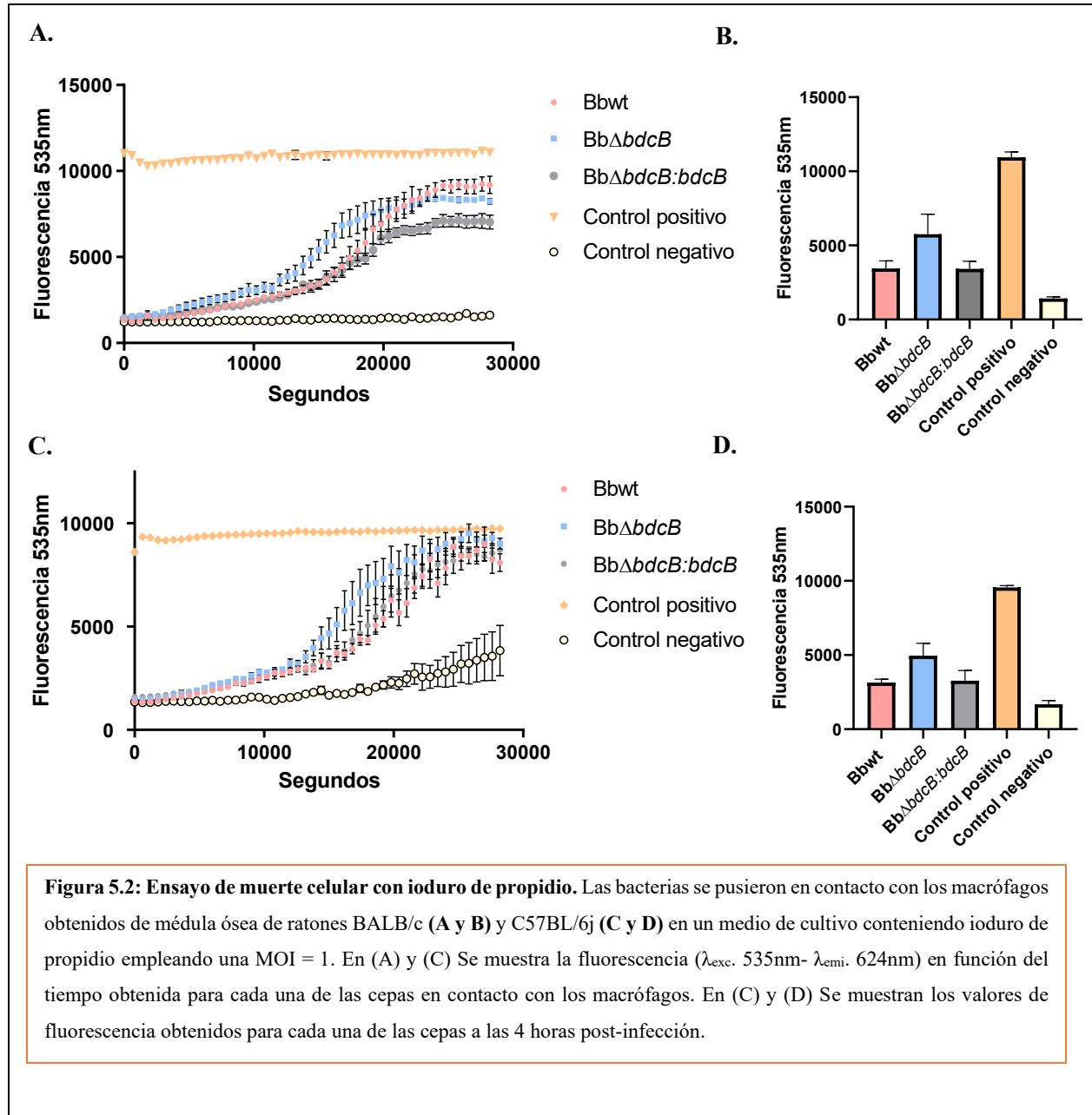


Figura 5.2: Ensayo de muerte celular con yoduro de propidio. Las bacterias se pusieron en contacto con los macrófagos obtenidos de médula ósea de ratones BALB/c (A y B) y C57BL/6j (C y D) en un medio de cultivo conteniendo yoduro de propidio empleando una MOI = 1. En (A) y (C) Se muestra la fluorescencia ($\lambda_{exc.}$ 535nm- $\lambda_{emi.}$ 624nm) en función del tiempo obtenida para cada una de las cepas en contacto con los macrófagos. En (C) y (D) Se muestran los valores de fluorescencia obtenidos para cada una de las cepas a las 4 horas post-infección.

En la figura 5.2.A vemos que a medida que transcurre el tiempo se produce un incremento en la fluorescencia para todas las cepas. Durante las primeras tres horas post-infección (10800 segundos) las tres cepas presentan un incremento de fluorescencia similar, pero a tiempos posteriores la cepa *BbΔbdcB* comienza a incrementar la fluorescencia más rápidamente que la cepa *Bbwt* y la cepa *BbΔbdcB:bdcB*, hasta que a las seis horas las tres curvas alcanzan un valor máximo de fluorescencia cercano a 10000. Este comportamiento se puede observar tanto en macrófagos BALB/c como C57BL/6j (figura 5.2.C).

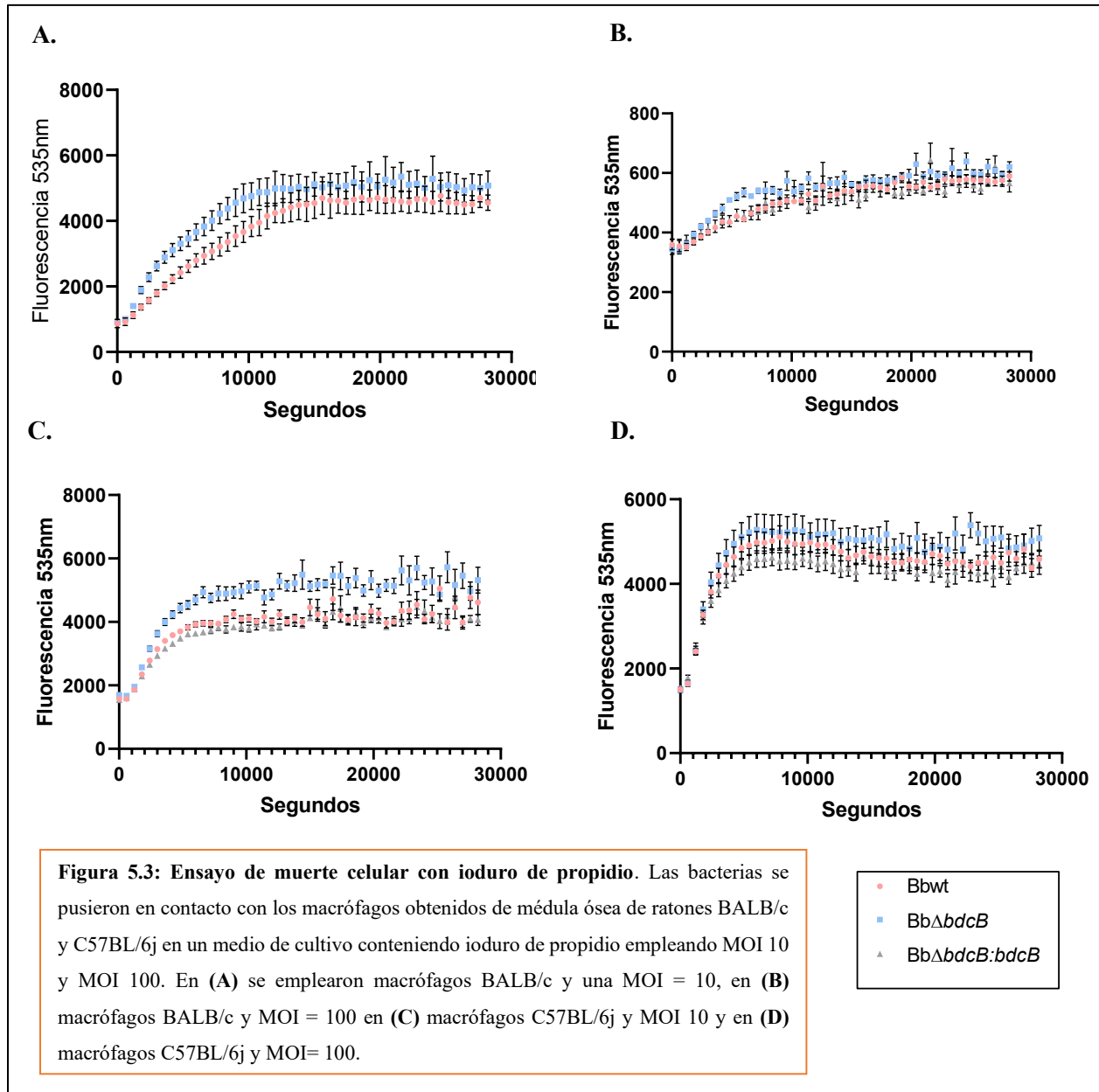
Capítulo 5

Los gráficos que se muestran en las figuras 5.2.B y 5.2.D corresponden a la fluorescencia medida a las 4 horas post-infección (14400 segundos). Como se puede ver, la fluorescencia medida a este tiempo para las fosas donde están en contacto los macrófagos con la cepa *BbΔbdcB* es mayor a la fluorescencia obtenida en los macrófagos en contacto con la cepa *Bbwt* o *BbΔbdcB:bdcB*.

En la figura 5.3 se muestran los resultados obtenidos en los ensayos con MOI= 10 y MOI= 100. En los ensayos realizado con MOI= 10 (figura 5.3.A y 5.3.C) podemos ver que la fluorescencia va aumentando rápidamente para tres cepas ensayadas. En las primeras tres horas del ensayo, la cepa *BbΔbdcB* presenta un mayor aumento en la fluorescencia respecto de las cepas *Bbwt* y *BbΔbdcB:bdcB*, pero a tiempos mayores todas las cepas alcanzan el mismo valor de fluorescencia máximo. Los resultados obtenidos para MOI= 10 en macrófagos C57BL/6j y BALB/c coinciden entre sí.

Para el caso de los ensayos realizados a MOI= 100 (figura 5.3.B y 5.3.D) vemos un rápido incremento en la fluorescencia para las tres cepas ensayadas y en menos de una hora de iniciado el ensayo todas las cepas alcanzan el valor máximo de fluorescencia.

Es necesario destacar que los ensayos a MOI= 10 y MOI= 100 fueron realizados con un lote de colorante IP diferente al empleado a MOI= 1. Probablemente esto hizo que la fluorescencia para MOI= 1 alcanzara valores mucho más altos (10000) que a MOI= 10 y 100 (6000).



En resumen, estos resultados muestran que los macrófagos en contacto con la cepa *BbΔbdcB* se mueren antes que en presencia de la cepa *Bbwt* o *BbΔbdcB:bdcB* a MOI= 1 y MOI= 10. Este resultado coincide con el resultado de LDH donde demostramos que *BbΔbdcB* presenta una mayor citotoxicidad a MOI= 1. A MOI= 100 la muerte celular es tan rápida que se alcanza el valor máximo de fluorescencia en menos de una hora, por lo que, probablemente debido a esto, no podemos ver diferencias significativas entre las curvas de las diferentes cepas.

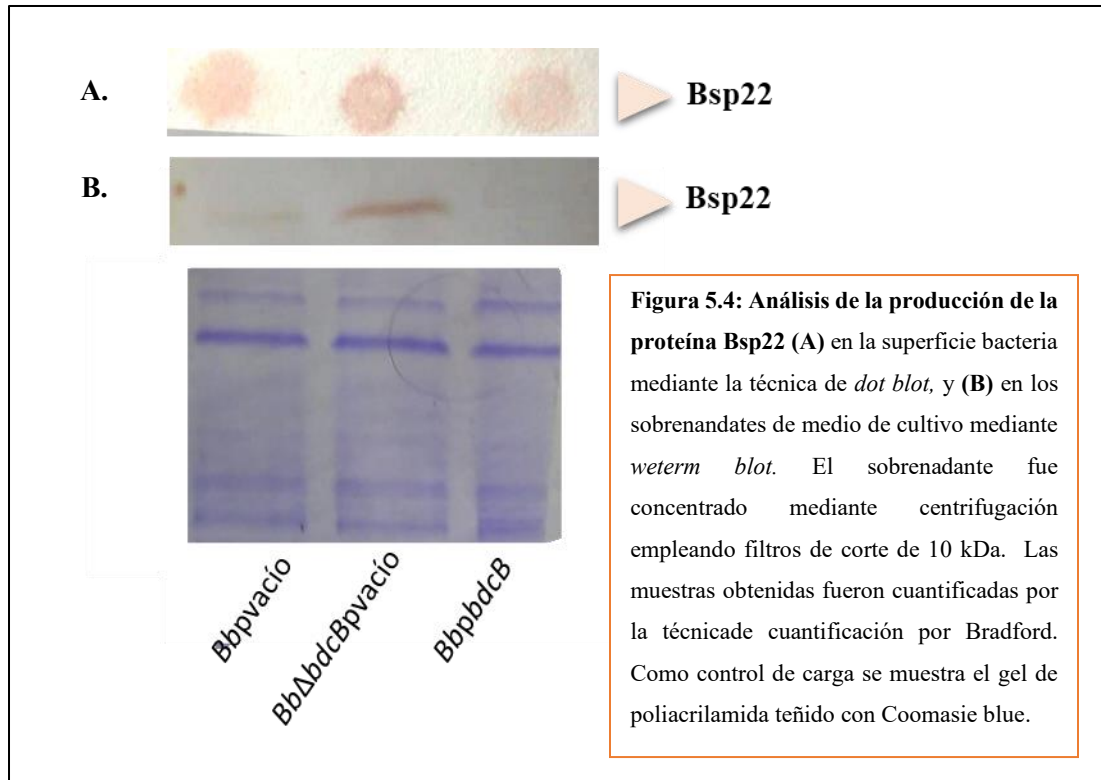
Análisis del Sistema de secreción tipo 3

En el capítulo anterior analizamos la expresión de cinco factores de virulencia que han sido ampliamente descritos y analizados por ser importantes para la patogénesis de *Bordetella spp.*

Dado que en los ensayos de medida de LDH y en el ensayo con IP vemos que la cepa *BbΔbdcB* presenta una mayor citotoxicidad respecto de la cepa *Bbwt* decidimos seguir profundizando en la caracterización de otro factor de virulencia, el sistema de secreción tipo 3 (SST3). Este sistema es requerido para ejercer un efecto citotóxico sobre diferentes células eucariotas fagocíticas y no fagocíticas y es responsable de provocar la muerte celular muy rápida en macrófagos y líneas epiteliales^{110,114}. Adicionalmente, estudios previos en nuestro grupo de trabajo han demostrado que el c-di-GMP regula la expresión de este sistema²⁴⁰.

Para llevar a cabo este análisis, en primer lugar, analizamos la producción de la proteína Bsp22. Esta proteína es la más abundante de la porción extracelular del SST3. Se la puede encontrar adherida a la superficie de la bacteria o libre en el sobrenadante de cultivo. Con lo cual, realizamos un ensayo de *dot blot* a fin de analizar la presencia de la proteína en la superficie bacteriana. Además de analizar a la cepa *Bbwt* y *BbΔbdcB*, empleamos como control a la cepa *Bbpbdcb* que sobreexpresa a *bdcB*. Como anticuerpo primario empleamos anticuerpos anti-Bsp22 de ratón y como anticuerpo secundario un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a HRP. El resultado se muestra en la figura 5.4.A, donde se puede apreciar una mayor presencia de Bsp22 en la cepa *BbΔbdcB* comparada con la cepa *Bbwt*, mientras que la cepa *Bbpbdcb* presenta una menor producción respecto de la cepa *Bbwt*. Estos resultados son coherentes con estudios previos publicados por nuestro grupo que muestran que la señalización por c-di-GMP inhibe la expresión de SST3²⁴⁰.

En segundo lugar, analizamos la presencia de Bsp22 en los sobrenadantes de cultivo mediante la técnica de *Western blot*.

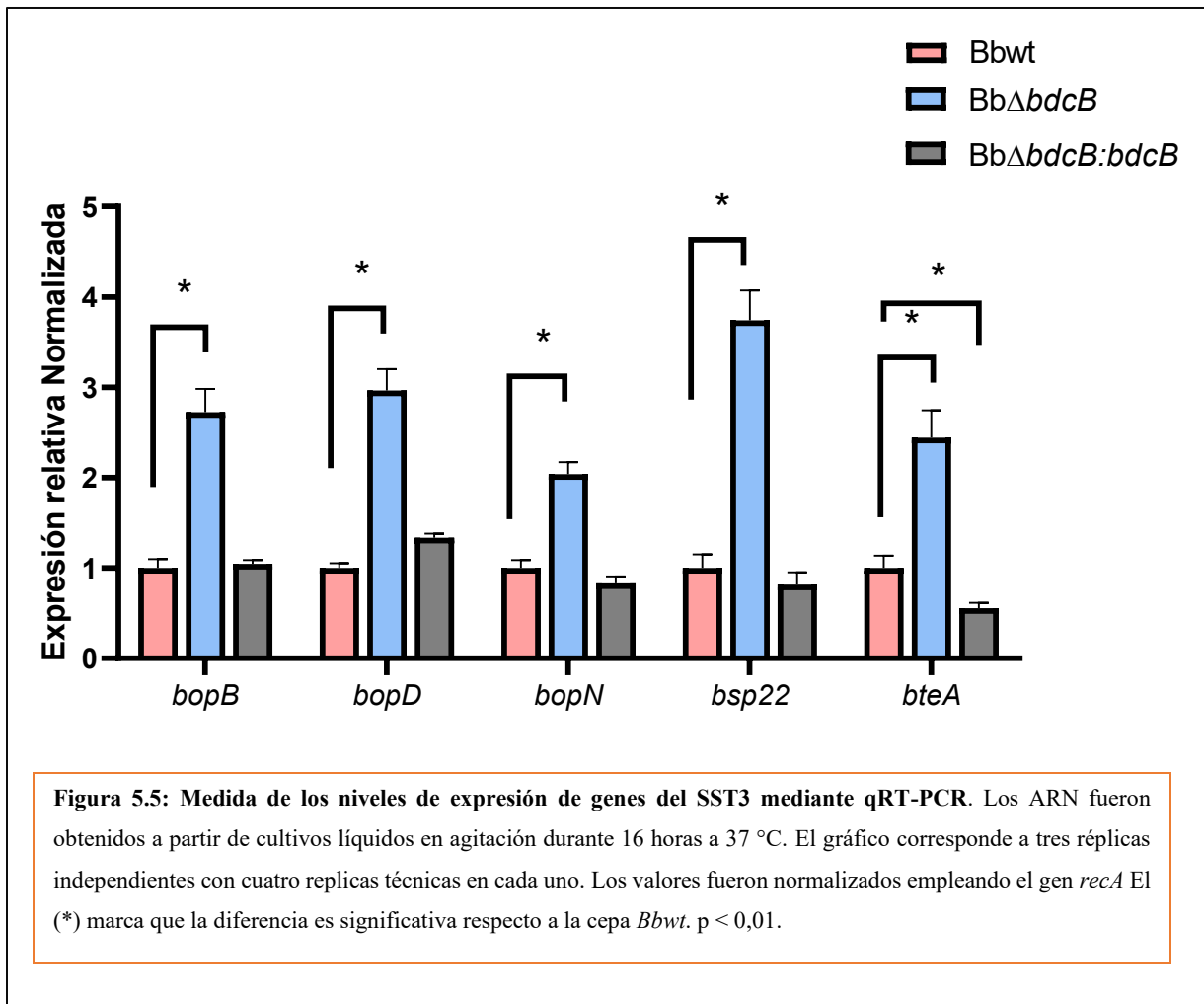


De manera similar a los resultados del *dot blot*, el sobrenadante de la cepa *BbΔbdcB* presentó una mayor cantidad de la proteína Bsp22 respecto de la cepa *Bbwt*, mientras que, la sobreexpresión de *bdcB* condujo a una reducción en los niveles de esta proteína (figura 5.4.B).

Seguidamente decidimos analizar la expresión de otros componentes del SST3 a nivel transcripcional. Analizamos la transcripción de cinco componentes de este sistema que han sido estudiados y que se ha demostrado que su delección afecta la citotoxicidad de *B. bronchiseptica*: *bopB* y *bopD* que codifican para las proteínas que tienen la capacidad de interaccionar y formar poros en la membrana plasmática de la célula huésped para permitir el pasaje de las proteínas efectoras, entre otras, *bteA* que codifica para una de las proteínas efectoras del sistema y *bopN* que codifica para una proteína que funciona como un “tapón” para prevenir la secreción hasta que se cumplan las condiciones adecuadas (contacto con la célula huésped o determinadas condiciones *in vitro*) y de *bsp22*^{109,110,114}.

Este análisis lo realizamos mediante qRT-PCR a partir de los ARN obtenidos de cultivos líquidos en medio SS, en agitación durante 16 horas a 37 °C.

Los resultados se muestran a continuación:



En la figura 5.5 se observa que *BbΔbdcB*, además de presentar una mayor producción de Bsp22 como vimos en los resultados de *dot blot* y *Western blot*, presenta un mayor nivel de transcripción de *bsp22* respecto de la cepa *Bbwt*. Adicionalmente, *BbΔbdcB* presenta una mayor expresión de *bopN*, *bopB*, *bopD* y *bteA* respecto de la cepa control. Por otro lado, los niveles de expresión de los componentes del SST3 en la cepa *BbΔbdcB:bdcB* no presentan diferencias significativas respecto de la cepa *Bbwt*, a excepción del gen *bteA*, que se encuentra disminuido en *BbΔbdcB:bdcB*. Por lo tanto, estos resultados indican que BdcB estaría reprimiendo la expresión de factores estructurales y proteínas efectoras del SST3 en *B. bronchiseptica*.

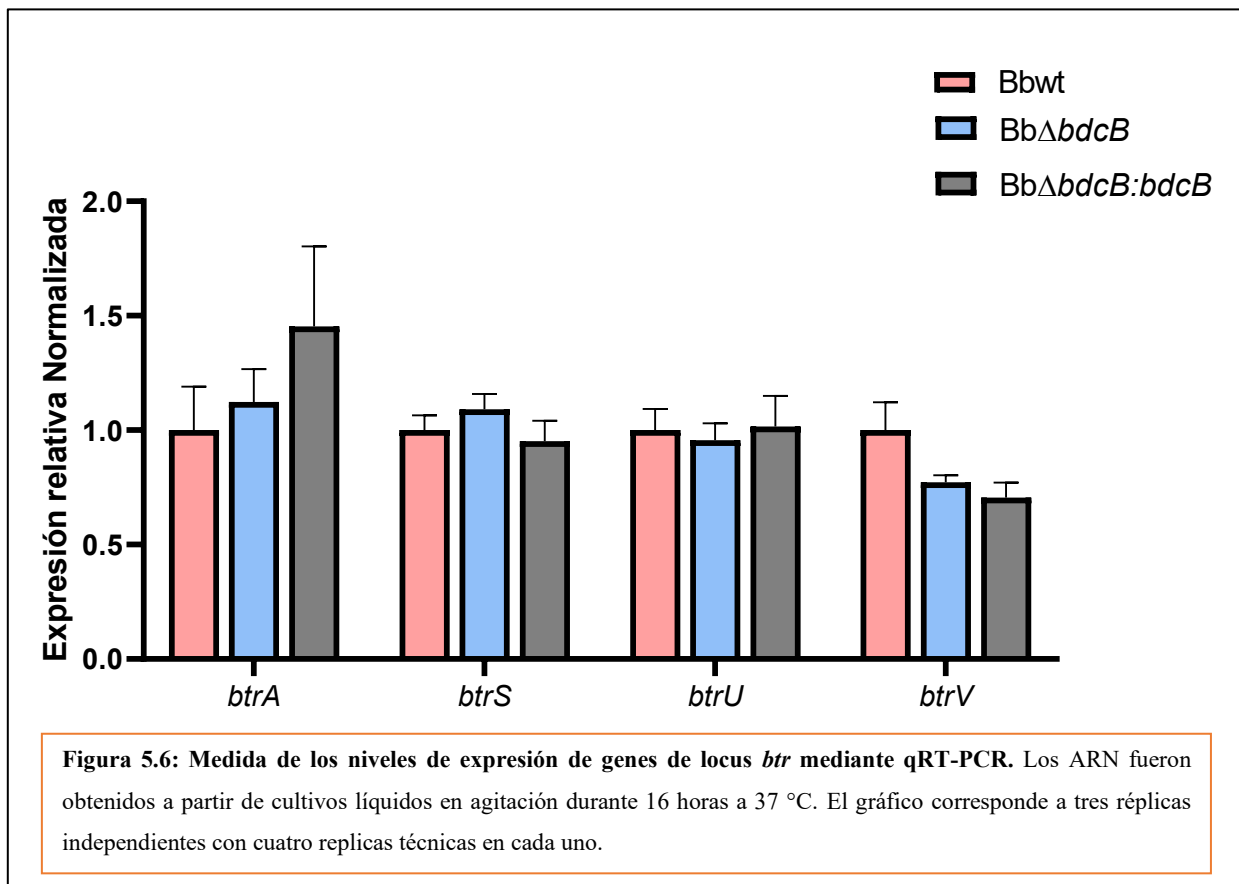
Análisis de los reguladores del SST3

Como se describió en la introducción general, adyacente al locus que codifica para las proteínas del SST3 se ha identificado otro locus, el locus *btr*, que codifica para proteínas reguladoras del SST3¹¹².

Dado que nuestros resultados previos muestran que BdcB regula la expresión de diferentes componentes del SST3 nos propusimos analizar si el efecto inhibitorio que ejerce BdcB se da a través de la regulación de la expresión de alguno de los factores de transcripción Btr.

Para ello realizamos extracción de ARN a partir cultivos líquidos en medio SS de las cepas *Bbwt*, *BbΔbdcB* y *BbΔbdcB:bdcB*, y medimos los niveles de expresión de los genes *btrS*, *btrA*, *btrU* y *btrV* mediante qRT-PCR, utilizando el gen *recA* como normalizador.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.6, donde se puede observar que no hay diferencias significativas en los niveles de expresión de los cuatro genes analizados en las tres cepas ensayadas.



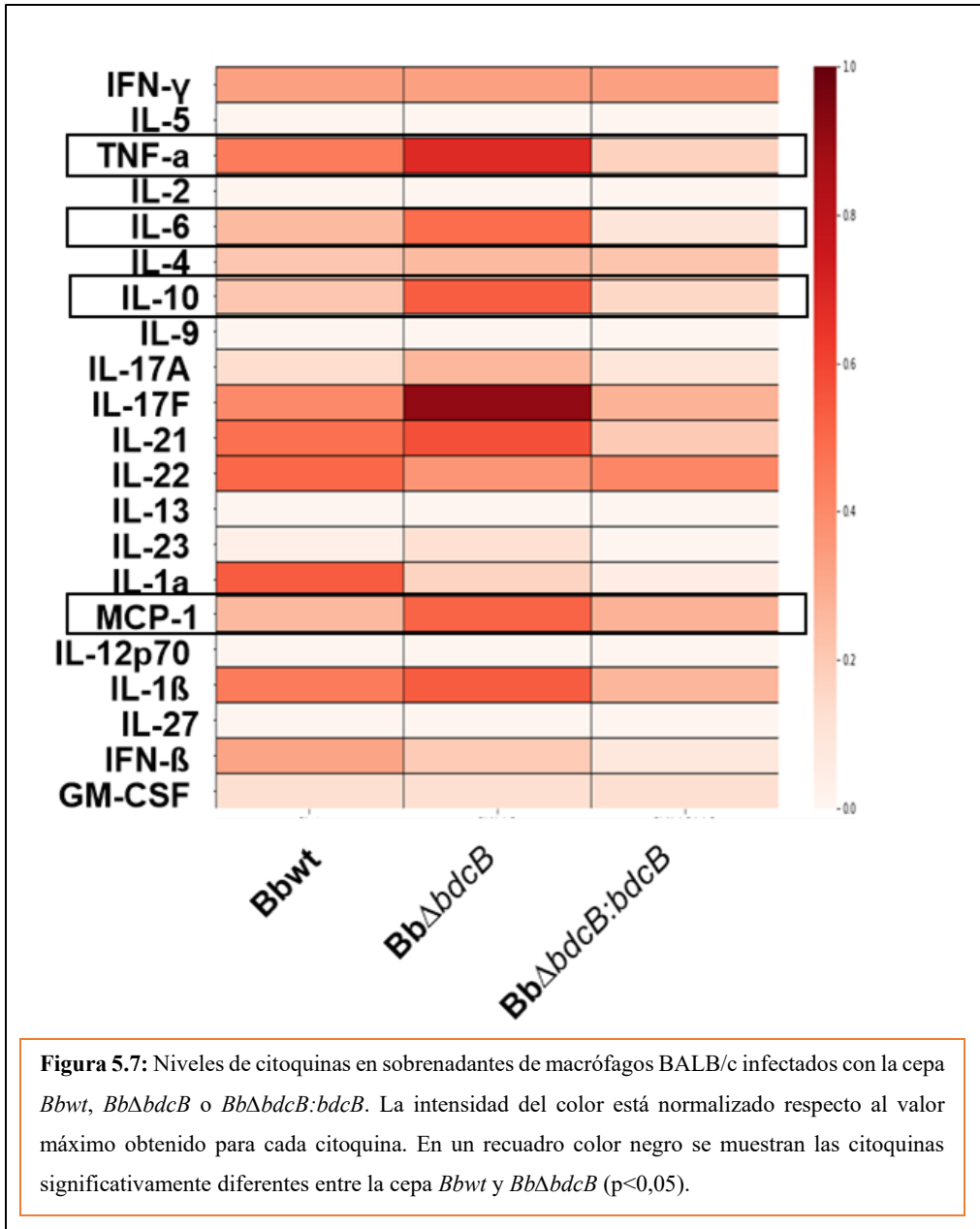
Estudio del rol de BdcB en respuesta inmune generada por los macrófagos en contacto con *B. bronchiseptica*

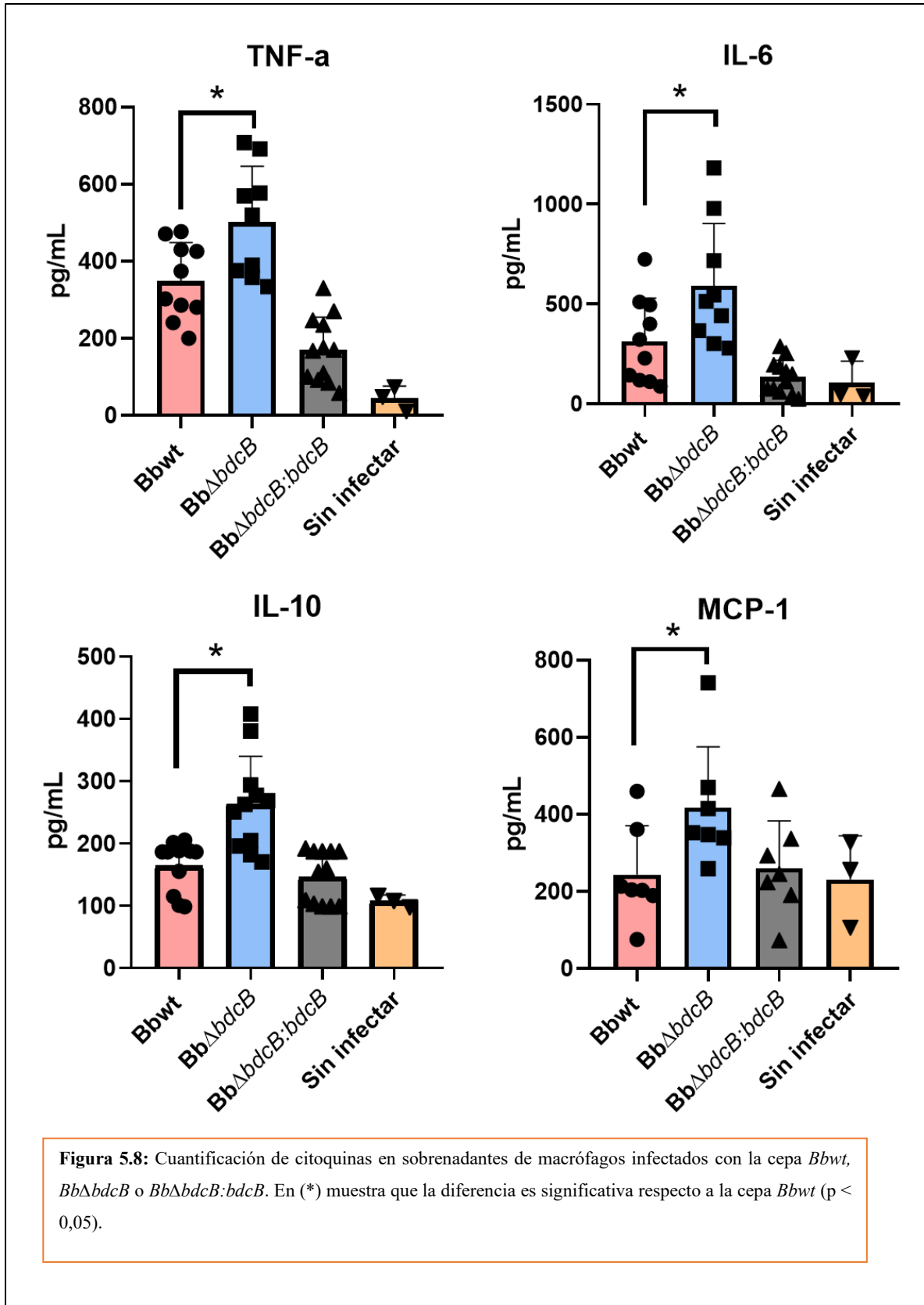
Los resultados obtenidos indican que la cepa delecionada en *bdcB* es más citotóxica y presenta una mayor expresión de diferentes componentes del SST3. Este sistema, además de estar implicado en la citotoxicidad de la bacteria contra las células eucariotas también está implicado en la modulación de la respuesta inmune²⁷⁶. Con lo cual, nos propusimos analizar si la ausencia de BdcB en la bacteria modifica también los niveles de expresión de las citoquinas liberadas por los macrófagos en contacto con la bacteria.

Para llevar a cabo este análisis, incubamos a las bacterias *Bbwt*, *BbΔbdcB* y *BbΔbdcB:bdcB* en contacto con los macrófagos BALB/c, y luego de 4 horas post-infección tomamos el sobrenadante de cultivo para hacer las determinaciones de los niveles de citoquinas.

Las determinaciones propiamente dichas las realizamos empleando el kit comercial LEGENDplex que cuenta con diferentes versiones en función de las citoquinas que se quieren analizar. Para este estudio empleamos: el panel T-helper (Th) que permite la cuantificación de las citoquinas IL-2, 4, 5, 6, 9, 10, 13, 17A, 17F, 22, IFN- γ y TNF- α y el panel de inflamación que permite la cuantificación de las citoquinas IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-23, IL-27, MCP-1, IFN- β , IFN- γ , TNF- α y GM-CSF.

A modo de resumen, se muestra en la figura 5.7 un mapa de colores que representa según la intensidad de color la cantidad de citoquina obtenida para cada cepa. Además, en la figura 5.8 graficamos la cuantificación de citoquinas que presentaron diferencias significativas entre las cepas ensayadas.





En la figura 5.8 se puede observar que los sobrenadantes de cultivo de los macrófagos en contacto con la cepa *BbΔbdcB* presentan una mayor producción de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-6 como así también una mayor producción de la quimioquina MCP-1, un quimioatrayente de monocitos. Además de estas citoquinas pro-inflamatorias también los macrófagos en contacto con la cepa *BbΔbdcB* presentaron un aumento en los niveles de la interleuquina anti-inflamatoria IL-10.

En resumen, este ensayo muestra que BdcB participaría en modulación de la respuesta inmune producida por *B. bronchiseptica* en contacto con los macrófagos.

Discusión

En el capítulo anterior observamos que en ensayos de infección de macrófagos *in vitro* el mutante en *bdcB* no es recuperado a partir de las 4 horas post-infección. Este resultado nos llevó a profundizar cuál es el rol que tiene BdcB en la vida intracelular de la bacteria, y analizar el aporte de BdcB en la citotoxicidad de *B. bronchiseptica* sobre macrófagos derivados de médula ósea de ratón. Mediante la cuantificación de LDH identificamos que la cepa *BbΔbdcB* presenta una mayor citotoxicidad respecto de la cepa *Bbwt* a una MOI= 1, y mediante el ensayo con ioduro de propidio observamos que esta mutación también provoca una muerte celular más rápida de los macrófagos tanto a una MOI= 1 como a una MOI= 10. Estos resultados fueron inesperados ya que, tal como mencionamos en el capítulo anterior, nuestra hipótesis era que la cepa *BbΔbdcB* no es recuperada dentro de los macrófagos por su incapacidad de resistir a los mecanismos bactericidas de éstos.

Varios autores han demostrado que *B. bronchiseptica* presenta un SST3 funcional que le permite transportar proteínas efectoras directamente dentro de las células eucariotas para alterar la señalización de la célula huésped e inducir la muerte en las células del sistema inmune tanto *in vitro* como *in vivo*^{110,277,278}. Incluso se ha demostrado que solo la ausencia de Bsp22 o de BteA es suficiente para evitar la muerte de los macrófagos y presentar una citotoxicidad disminuida²⁷⁹. Sumado a esto, en trabajos previos de nuestro grupo hemos visto que el c-di-GMP está implicado en la regulación del SST3. Como en la mayoría de las bacterias, el aumento de la concentración de c-di-GMP induce la represión de la expresión del SST3²⁴⁰. Sin embargo, hasta el momento no se han identificado diguanilato ciclasas o fosfodiesterasas específicas implicadas en esta regulación. Este conjunto de resultados nos llevó a proponer como hipótesis que la mayor citotoxicidad de la cepa *BbΔbdcB* podría deberse a un aumento en la expresión de los componentes del SST3.

Mediante ensayos por *dot blot*, *Western blot*, y qRT-PCR demostramos que *BbΔbdcB* presenta una mayor expresión y producción de Bsp22, y una mayor expresión de *bopN*, *bopD*, *bopB*, y del efector *bteA*, indicando con esto que BdcB estaría implicada en la supresión de SST3 en *B. bronchiseptica*. Estos resultados son coincidentes con lo observado previamente por nuestro grupo. La sobreexpresión de una diguanilato ciclasa y por lo tanto el aumento de la concentración de c-di-GMP induce la represión de la expresión del SST3²⁴⁰. Probablemente esta supresión del SST3 llevada a cabo por BdcB determina una menor citotoxicidad de la bacteria permitiéndole permanecer dentro de las células del sistema inmune como son los macrófagos.

Uno de los factores secretados por el SST3 que observamos que está regulado por BdcB es BteA. Esta toxina (previamente BopC) fue descrita anteriormente por otros autores como una potente toxina capaz de inducir necrosis de células de mamífero^{280,281}. Precisamente, la delección del gen *bteA* le impide a

B. bronchiseptica desarrollar citotoxicidad en células HeLa²⁸⁰. Por lo tanto, una hipótesis posible es que la citotoxicidad aumentada de *BbΔbdcB* se deba a la sobreexpresión de BteA. Si esto fuera así, la delección de *bteA* en la cepa *BbΔbdcB* debería disminuir la citotoxicidad a valores similares a los que induce la cepa *BbΔbteA*. La expresión de *bteA* es regulada por el sistema de dos componentes BvgAS y por el factor sigma BtrS¹¹². Esto confirma que el SST3 está finamente regulado por diversos sistemas, al que ahora podemos sumarle la red del segundo mensajero c-di-GMP.

En un trabajo publicado por Rivera y colaboradores demuestran que *B. bronchiseptica*, luego de ser internalizada dentro de los macrófagos RAW 264.7, a las dos horas post-infección, suprime la expresión del SST3 y aumenta la expresión de proteínas implicadas en la reparación del daño celular, la reparación del ADN, el estrés oxidativo, estrés por pH y activa vías metabólicas específicas¹⁵⁹. Con los resultados obtenidos en este capítulo y los resultados de sobrevida a estreses realizados en el capítulo anterior proponemos que BdcB puede estar participando en la supresión del SST3 y en la activación de la expresión de genes necesarios para la vida intracelular, como por ejemplo la respuesta a estrés por pH para poder persistir dentro del macrófago.

A partir del hallazgo de que *BbΔbdcB* presenta mayores niveles de expresión de componentes del SST3 consideramos la hipótesis de que BdcB podría estar regulando la expresión de alguno de los genes del locus *btr*, un grupo de factores involucrados en el control de la expresión de componentes de SST3. Se ha demostrado que el factor sigma BtrS se requiere para la expresión de loci del SST3, BtrU y BtrW para la secreción de las proteínas efectoras a través del aparato del SST3, BtrV es esencial para la traducción y/o la estabilidad de las proteínas, y recientemente se ha identificado a BtrA, un factor anti-sigma de BtrS que ejerce un control negativo sobre la expresión del SST3^{112,282,283}. Mediante cuantificación por qRT-PCR demostramos que BdcB no regula la expresión de *btrA*, *btrS*, *btrU* y/o *btrV*, indicando con esto que BdcB regularía la expresión de factores del SST3 por mecanismos independientes a estos sistemas de regulación.

En *B. pertussis* se encontró que la chaperona Hfq es necesaria para regular la expresión de algunos genes del SST3 como *bopN*, *bopD*, *bsp22*, e incluso de *bteA* que no es parte del locus *bsc*. La expresión de estos genes estuvo disminuida en el mutante *hfq* mientras que no se vio afectada la expresión de los genes del regulón *btr*^{113,284}. Hfq es una chaperona que puede asociarse con varios ARN pequeños (ARNs) y ARNm para regular la expresión de genes diana a nivel postranscripcional en diversas bacterias²⁸⁵. Debido a la amplia variedad de ARNs y ARNm que pueden unirse a Hfq, se ha descrito que Hfq participa en numerosos fenotipos, como la regulación del crecimiento bacteriano, la quimiotaxis y la movilidad, la formación de *biofilm* y la expresión del factor de virulencia, similares a los fenotipos regulados por c-di-GMP. De hecho, se han descrito diversas maneras en la que estos dos sistemas de regulación se relacionan²⁸⁶.

Hfq regula directamente la actividad de las enzimas que participan en el metabolismo de c-di-GMP en algunas bacterias. En *Yersinia pestis*, Hfq promueve la expresión a nivel transcriptional del gen *hmsP* que codifica para una fosfodiesterasa y disminuye el nivel postranscripcional del gen *hmsT* que codifica una diguanilato ciclasa al reducir la estabilidad de su ARNm²⁸⁷. Además, Hfq puede regular la expresión y producción de las diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas a niveles transcripcionales, postranscripcionales, traduccionales y postraduccionales²⁸⁶. En *V. cholerae*, se ha reportado que algunos ARNs pueden participar en la regulación de las enzimas implicadas en el metabolismo de c-di-GMP en un mecanismo mediado por Hfq²⁸⁸. Por ejemplo, Qrr (un ARN regulador de *quorum sensing*), y Vca0939 es una diguanilato ciclasa de *V. cholerae*. Qrr puede aparearse con la secuencia líder del ARNm de vca0939 con la ayuda de Hfq para exponer el sitio de unión al ribosoma e iniciar la expresión de vca0939, lo que provoca un aumento en la concentración intracelular de c-di-GMP y la formación de *biofilm*^{288,289}. Existen también reportes que describen que Hfq puede regular la concentración de c-di-GMP intracelular pero los mecanismos son desconocidos. Por ejemplo, Pusic y colaboradores encontraron que en *P. aeruginosa*, cuando se elimina *hfq*, la formación de *biofilm* se reduce significativamente con una gran disminución en la concentración intracelular de c-di-GMP, pero el análisis de las secuencias de ARN en el mutante *hfq* mostró que el nivel transcripcional de los genes relacionados con las enzimas metabólicas de c-di-GMP no cambiaron significativamente²⁹⁰.

La notoria relación entre la regulación post-transcriptional por Hfq y la señalización con c-di-GMP en diversas bacterias no nos permite descartar la hipótesis de que exista un vínculo entre esta chaperona y BdcB en la regulación la expresión de genes del SST3 en *B. bronchiseptica*. En los análisis de transcriptómica en el que comparan la expresión de la cepa de *B. pertussis* silvestre con el mutante *hfq* no se observan cambios de expresión de *bdcB*, por lo que sería interesante analizar en un futuro si Hfq es capaz de inhibir de manera directa o indirecta a BdcB a nivel postraduccional para activar así los genes del SST3.

En la última parte del capítulo se describió que la muerte de los macrófagos inducida en presencia de *BbΔbdcB* está precedida por una mayor liberación de las citoquinas IL-6, IL-10, TNF- α y la citoquina quimioatrayente de monocitos MCP-1. La liberación de citoquinas por parte de las células eucariotas se ha sugerido como un mecanismo complementario para la eliminación de las bacterias mediante el reclutamiento de fagocitos²⁹¹. A menudo, en el contexto de infecciones bacterianas, el nivel de expresión de citoquinas y el grado de muerte celular están correlacionados²⁹². Por ejemplo, estudios realizados con FHA, muestran que esta adhesina promueve la apoptosis en varios tipos de células, y la apoptosis asociada a FHA en macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica humana está acompañada por la liberación de TNF- α de una manera dependiente de la dosis de FHA ²⁹³. Por otro lado, los patógenos emplean sus factores de virulencia de manera de alterar los niveles de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias como una estrategia para la persistencia. Dentro de los mecanismos que le han permitido

Capítulo 5

evadir la respuesta inmune a *B. bronchiseptica* se ha descrito que el SST3 aumenta la producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10 tanto *in vitro* como *in vivo*^{110,277,278}. También, a modo de ejemplo, la toxina adenilato ciclasa (CyaA), en presencia de LPS en células dendríticas y macrófagos, estimula la producción de las citoquinas IL-6 e IL-10 mientras inhibe la producción de las citoquinas IL-12, TNF- α y de la quimioquina CCL3¹⁰⁰. El aumento de citoquinas tanto pro-inflamatorias como TNF- α como anti-inflamatorias como IL-10 en macrófagos infectados con *Bb Δ bdcB* sugiere que puede haber distintos factores que estén afectando la respuesta del huésped. La mayor producción de IL-10 la podemos asociar con un mayor aumento de expresión de los componentes del SST3 de manera de suprimir la respuesta inmunitaria de los macrófagos. Si bien en nuestros ensayos no vimos diferencias en la expresión de factores de virulencia entre ambas cepas (resultados del capítulo 4) no podemos descartar que haya otros factores diferencialmente expresados en el mutante *Bb Δ bdcB* que estén estimulando la respuesta inmune.

Capítulo 6: Rol de BdcB en la colonización de las vías respiratorias en modelos de infección murinos

Introducción

En el capítulo anterior evaluamos el rol de BdcB en la interacción de *B. bronchiseptica* con las células del sistema inmune, los macrófagos, y observamos que BdcB regula negativamente la expresión del SST3 lo cual, en último término conllevaría a una disminución de la citotoxicidad y una mayor capacidad de persistencia dentro de los macrófagos. En este capítulo analizamos el rol de BdcB en la capacidad de *B. bronchiseptica* de infectar a un huésped natural como son los ratones.

La supervivencia del huésped dependerá de la capacidad del sistema inmunológico para mantener la esterilidad de los órganos vitales y eliminar rápidamente los microorganismos patógenos. Como tal, el tracto respiratorio inferior normalmente se mantiene estéril mediante la generación de respuestas inmunitarias que pueden medirse tanto a nivel local como sistémico. A su vez, la adaptación de las bacterias a un nicho tan especializado generalmente implica un conjunto específico de factores bacterianos que le permiten subvertir o sobrevivir a las respuestas inmunitarias del huésped.

Tras la inoculación intranasal de ratones con 1×10^5 a 1×10^6 bacterias, *B. bronchiseptica* produce una infección de las vías respiratorias superiores e inferiores. En los pulmones, los recuentos de bacterias alcanzan su punto máximo entre los 5 a 7 días y luego disminuyen, y las bacterias se eliminan de este órgano después de aproximadamente 4 semanas²⁹⁴. En la tráquea, las bacterias se eliminan después de seis semanas, pero son capaces de persistir indefinidamente en la nariz^{22,294}. Esta persistencia se ve facilitada por la expresión de los factores de virulencia durante la infección, como toxinas, adhesinas y LPS regulados globalmente por el sistema BvgAS^{142,295,296}. Varios de estos factores, incluido el SST3, no son necesarios para la colonización inicial, pero contribuyen a la persistencia de *B. bronchiseptica* en el tracto respiratorio inferior¹¹⁴.

A fin de analizar el rol de BdcB en la colonización de las vías respiratorias infectamos ratones C57BL/6j y BALB/c por vía intranasal con las cepas *Bbwt*, *BbΔbdcB* y *BbΔbdcB:bdcB* y analizamos la carga bacteriana en nariz, tráquea y pulmón a diferentes días post-infección. Tanto los ratones C57BL/6j como BALB/c son ampliamente utilizados en investigación, sin embargo, difieren en la respuesta inmune que generan. Los ratones BALB/c son propensos a una respuesta inmune Th2 y los ratones C57BL/6j a una respuesta Th1, lo que da como resultado una susceptibilidad diferente a una variedad de patógenos, incluidos *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi*, *Chlamydia muridarum*, *Burkholderia pseudomallei*, *Yersinia enterocolitica*, *Mycobacterium avium* y *L. monocytogenes*²⁹⁷⁻³⁰¹. Por lo tanto, consideramos importante analizar el rol de BdcB durante el proceso de infección en ambas cepas de ratones. Además, analizamos la producción de citoquinas y quimioquinas a nivel local en la cavidad nasal y en los pulmones de los ratones infectados al día 7 post-infección.

Por último, analizamos el rol de BdcB en la capacidad de *B. bronchiseptica* de propagarse desde las vías superiores a las vías inferiores del tracto respiratorio empleando una estrategia descrita y empleada por varios autores que consiste en la inoculación intranasal de dosis bajas de carga bacteriana⁴⁴⁻⁴⁸.

Rol de BdcB en la colonización de las vías respiratorias

A fin de analizar si BdcB presenta un rol durante el proceso de infección, en primer lugar, infectamos ratones BALB/c con las cepas *Bbwt*, *BbΔbdcB* y *BbΔbdcB:bdcB* con una dosis inicial de 1×10^5 bacterias en 30μl de PBS y realizamos recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en la cavidad nasal, la tráquea y los pulmones de los ratones infectados a los días 7, 14, 28 y 56 post-infección.

En la figura 6.1 (columna derecha) podemos observar que la cepa *Bbwt* presenta una cinética de colonización típica tanto para nariz, tráquea y pulmón. Al día 7 post-infección se observa el punto de mayor número de bacterias recuperadas tanto en nariz, tráquea y pulmón (alrededor de 10^6 , 10^4 y 10^4 UFC/ml respectivamente). Entre los días 7 y 14 el número de UFC/ml se mantiene constante tanto en la cavidad nasal como en la tráquea, mientras que el número de bacterias comienza a descender en los pulmones probablemente por activación de una respuesta adaptativa del huésped. A partir del día 14 y hasta el día 56 el número de bacterias recuperadas de la cepa *Bbwt* disminuye paulatinamente tanto en la cavidad nasal como en tráquea, sin embargo, no es eliminada por completo. Por el contrario, en los pulmones, hacia el día 28 el número de UFC, si bien es detectable, es un número bajo y hacia el día 56 este número cae por debajo del límite de detección.

Cuando comparamos las curvas de infección en la cavidad nasal, la tráquea y los pulmones de la cepa *BbΔbdcB* con la cepa *Bbwt* vemos que no existen diferencias significativas en los recuentos de UFC en ninguno de los días analizados. Por su parte, la cepa *BbΔbdcB:bdcB* presentó un comportamiento similar a la cepa *Bbwt* en la infección de la cavidad nasal, tráquea y pulmón en todos los días analizados, a excepción del día 28 que *BbΔbdcB:bdcB* presentó un recuento de UFC menor que la cepa *Bbwt* en tráquea y pulmón.

Con este ensayo de infección podemos concluir la cepa deficiente en BdcB es capaz de infectar y colonizar las vías respiratorias de los ratones BALB/c con la misma eficiencia que lo hace la cepa *Bbwt*.

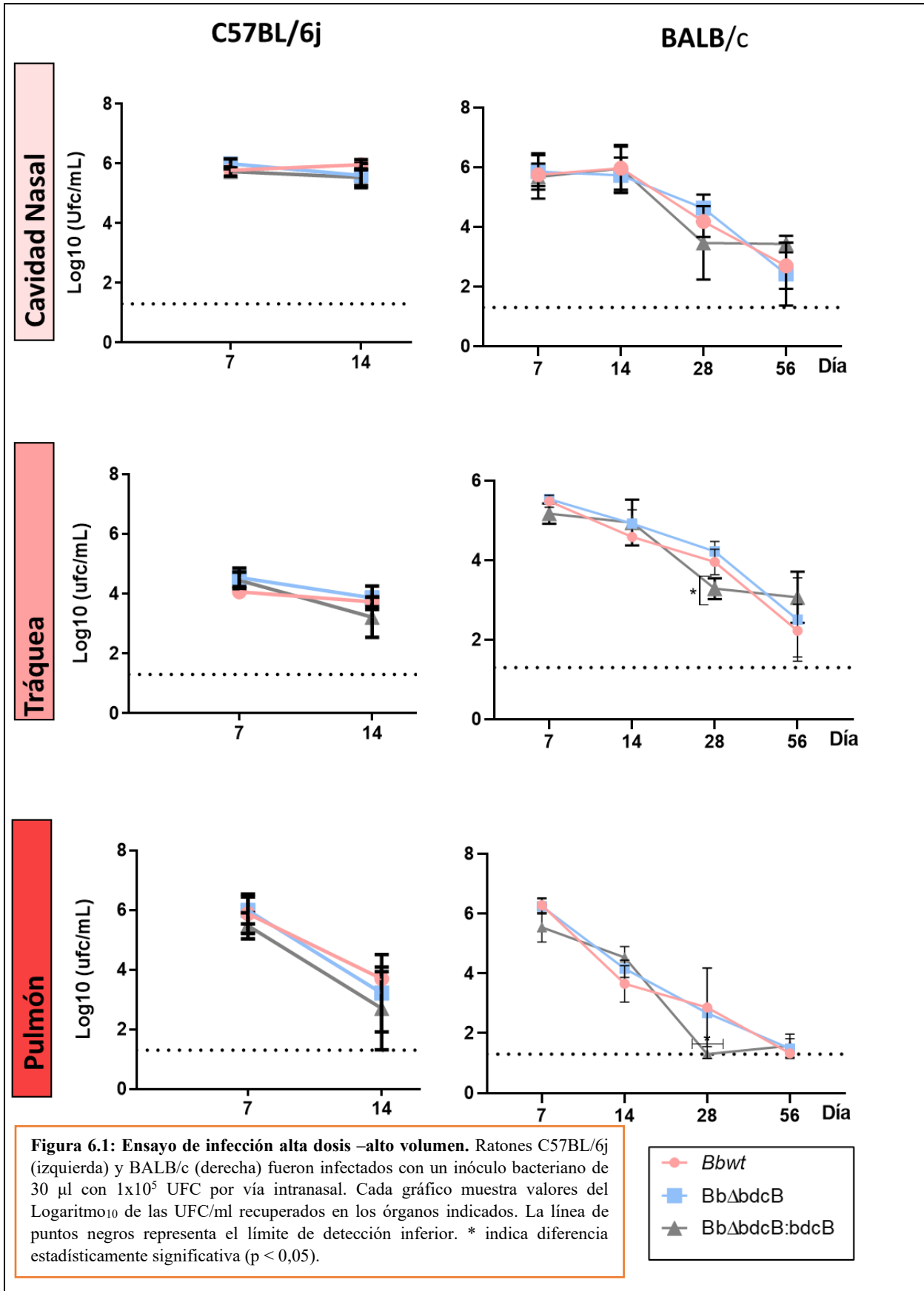
Adicionalmente, analizamos la infección producida por la cepa *BbΔbdcB* en ratones C57BL/6j. Estos ratones, al igual que los ratones BALB/c, son ampliamente utilizados para estudiar las infecciones por *Bordetella spp.* y como ya mencionamos, difieren en el perfil de respuesta inmune que desencadenan.

El inóculo de bacterias empleado para este ensayo fue el mismo que en el ensayo anterior, pero en este caso solo analizamos el recuento de bacterias en la cavidad nasal, tráquea y pulmón al día 7 y 14 post-infección. Los resultados se muestran en la figura 6.1 (columna izquierda), donde se observa que no hay

Capítulo 6

diferencias en la colonización de la cavidad nasal, tráquea y pulmón entre la cepa *Bbwt* y *BbΔbdcB* en los días analizados, y tampoco entre la cepa *BbΔbdcB:bdcB* y la cepa *Bbwt* en ninguno de los órganos y días analizados.

Por lo tanto, podemos concluir que, en las condiciones ensayadas, la ausencia de BdcB no afecta la capacidad de *B. bronchiseptica* de colonizar la cavidad nasal, la tráquea y los pulmones de ratones BALB/c y C57BL/6j.



Análisis de la respuesta inmune en la cavidad nasal

Con el antecedente descrito en el capítulo anterior que mostraba que la cepa *BbΔbdcB* difiere de respuesta de citoquinas generada en los macrófagos respecto de la cepa *Bbwt*, nos preguntamos si BdcB es capaz de modular la respuesta inmune también en el modelo de infección murino. Por lo tanto, analizamos la producción de citoquinas y quimioquinas, moléculas con la capacidad de activar, atraer y dirigir diversas familias de leucocitos circulantes hacia los sitios de infección. En primera instancia, analizamos la producción de citoquinas y quimioquinas en cavidad nasal de los ratones infectados con la cepa *BbΔbdcB* y la comparamos con las obtenidas en la infección con cepa *Bbwt*.

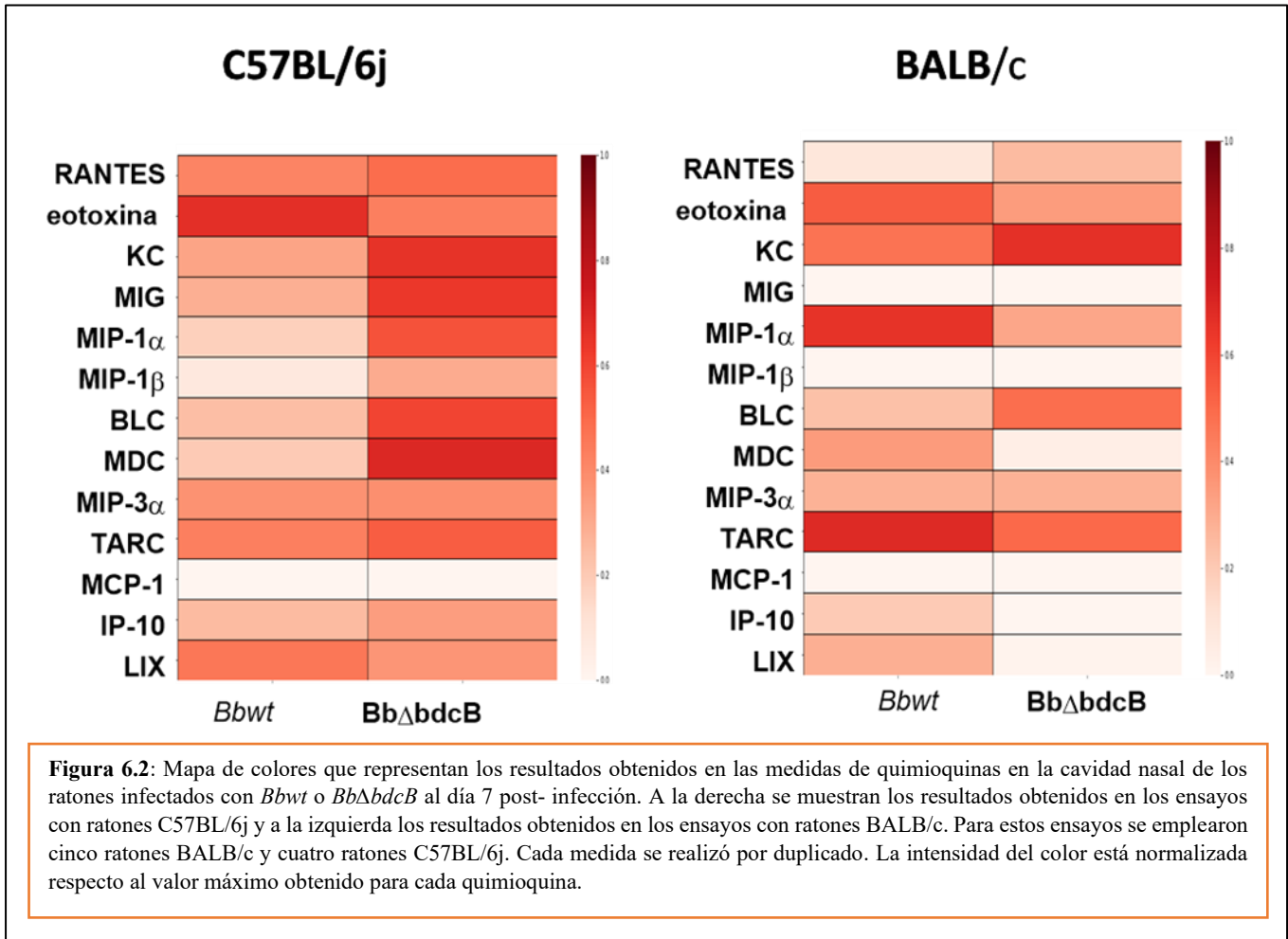
Empleamos las muestras de la cavidad nasal de los ratones BALB/c y C57BL/6j obtenidas al día 7 post-infección en los ensayos anteriores. Para el análisis de las quimioquinas empleamos el kit comercial LEGENDplex panel de quimioquinas proinflamatorias que permite la cuantificación simultánea de 13 quimioquinas de ratón, incluidas MCP-1 (CCL2), RANTES (CCL5), IP-10 (CXCL10), Eotaxina (CCL11), TARC (CCL17), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), MIG (CXCL9), MIP-3 α (CCL20), LIX (CXCL5), KC (CXCL1), BLC (CXCL13) y MDC (CCL22), y para el análisis de las citoquinas empleamos el panel de inflamación que incluye las siguientes citoquinas: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-23, IL-27, MCP-1, IFN- β , IFN- γ , TNF- α y GM-CSF.

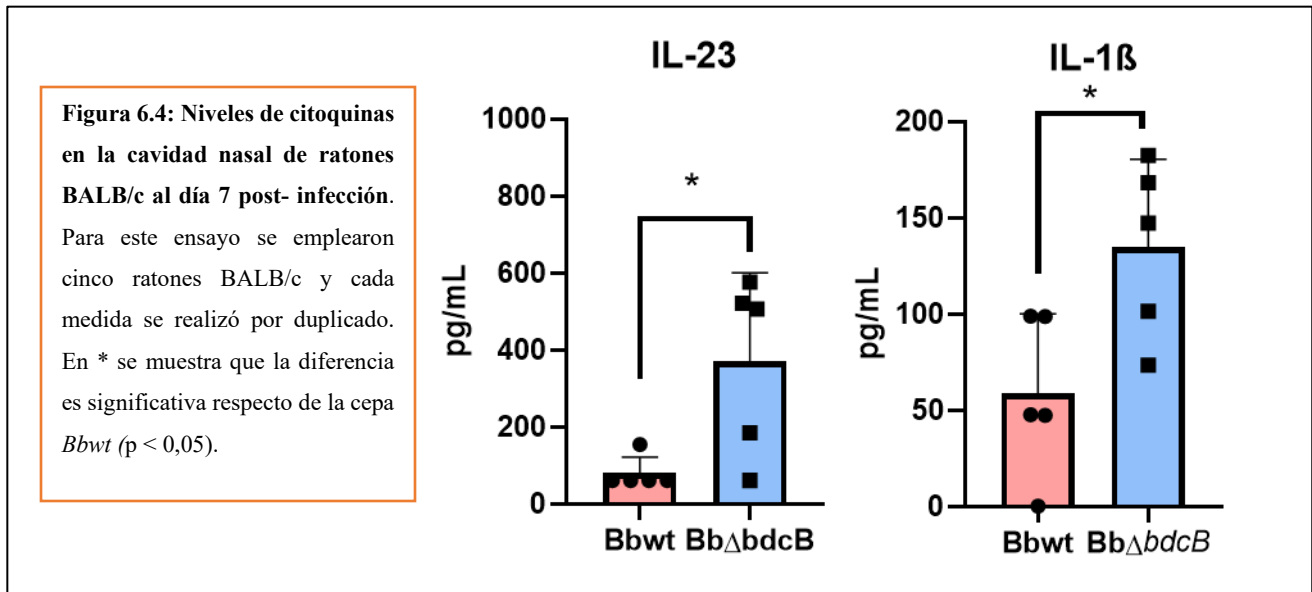
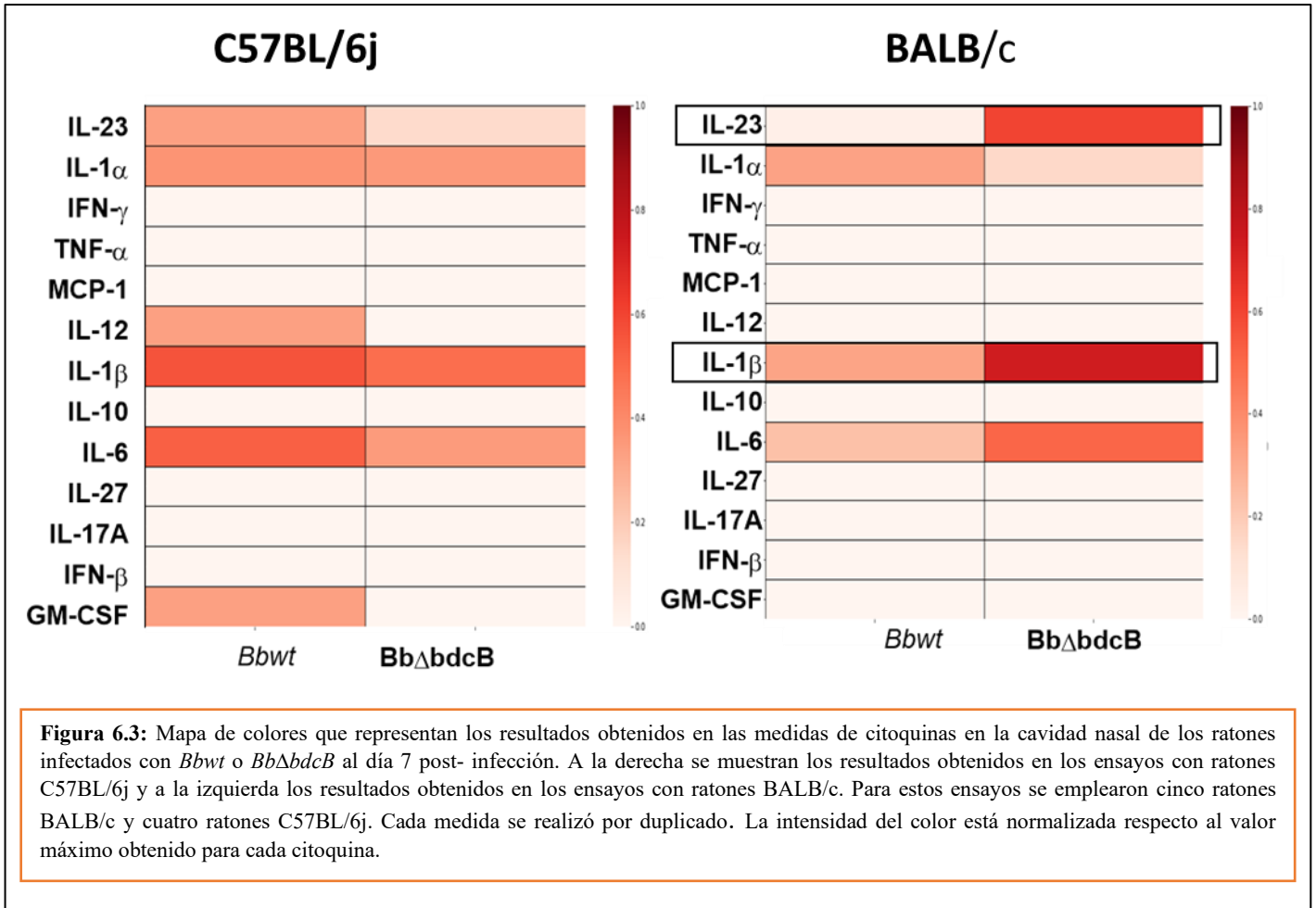
La cuantificación de cada quimioquina o citoquina obtenida en las cavidades nasales de los ratones BALB/c o C57BL/6j infectados con la cepa *Bbwt* y *BbΔbdcB* la analizamos de manera individual. Sin embargo, para una mejor visualización y dada la cantidad de quimioquinas y citoquinas analizadas, presentamos los resultados empleando mapas de colores que muestran la intensidad del color en función a la cantidad de citoquina o quimioquina obtenida.

En la figura 6.2 se muestran los mapas de colores que representan los resultados obtenidos en las medidas de las quimioquinas, y en la figura 6.3 se muestran los mapas de colores que representan los resultados obtenidos en las medidas de las citoquinas. Se resalta también en un recuadro negro la quimioquina/citoquina cuya concentración presentó diferencias estadísticamente significativas entre las cepas *BbΔbdcB* y *Bbwt*.

Respecto al resultado obtenido en el análisis de las quimioquinas en la cavidad nasal tanto de los ratones C57BL/6j como de los ratones BALB/c, vemos que no hay diferencias significativas en ninguna de las quimioquinas analizadas entre los ratones infectados con la cepa *Bbwt* y los infectados con la cepa *BbΔbdcB*.

Al analizar las citoquinas de ratones C57BL/6j, tampoco observamos diferencias significativas. Sin embargo, cuando analizamos la producción de citoquinas en los ratones BALB/c vemos que los ratones infectados con la cepa *BbΔbdcB* presentan un nivel significativamente mayor de la interleuquina IL-23 y la interleuquina proinflamatoria IL-1 β (figura 6.3 y figura 6.4)



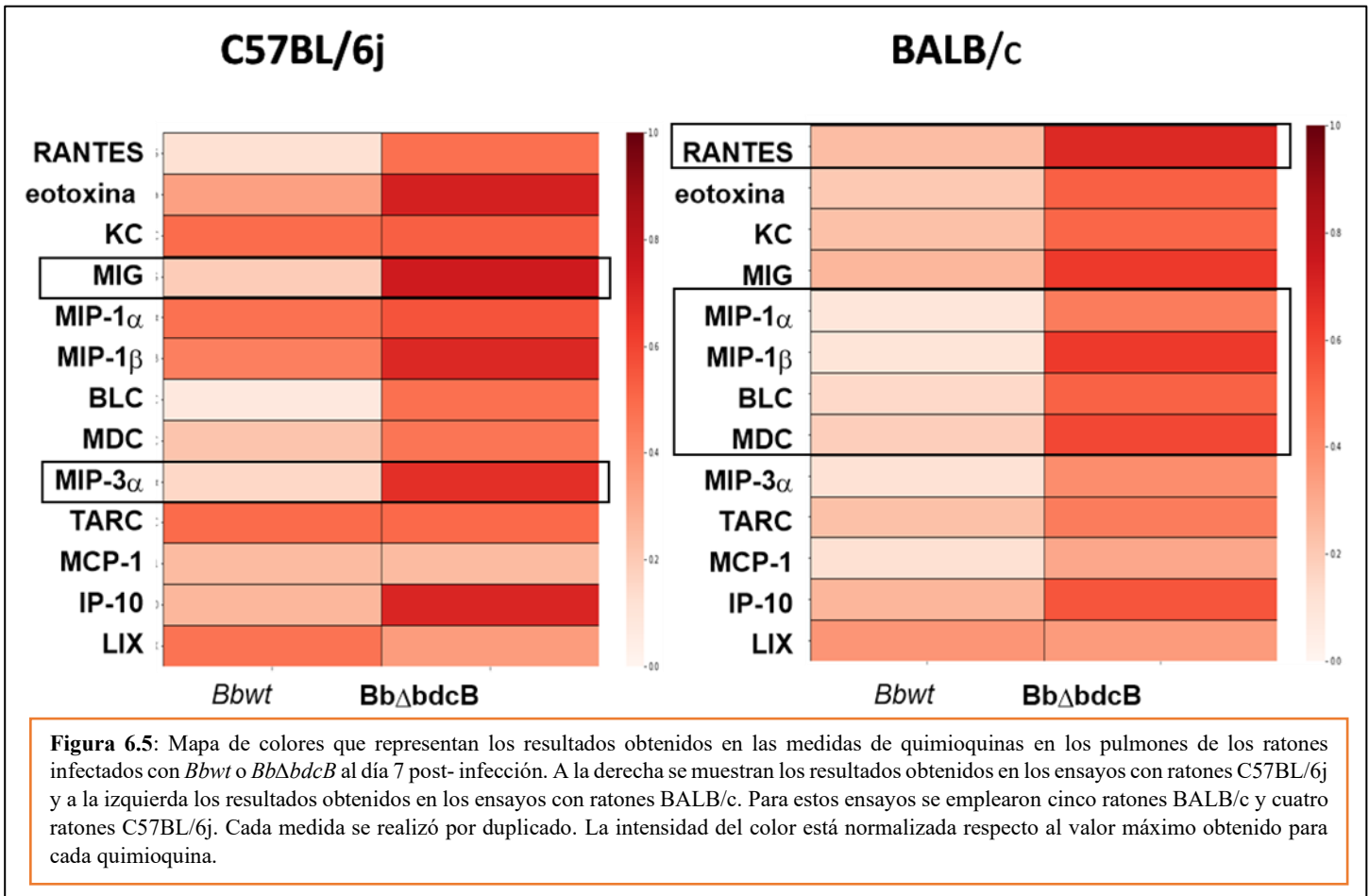


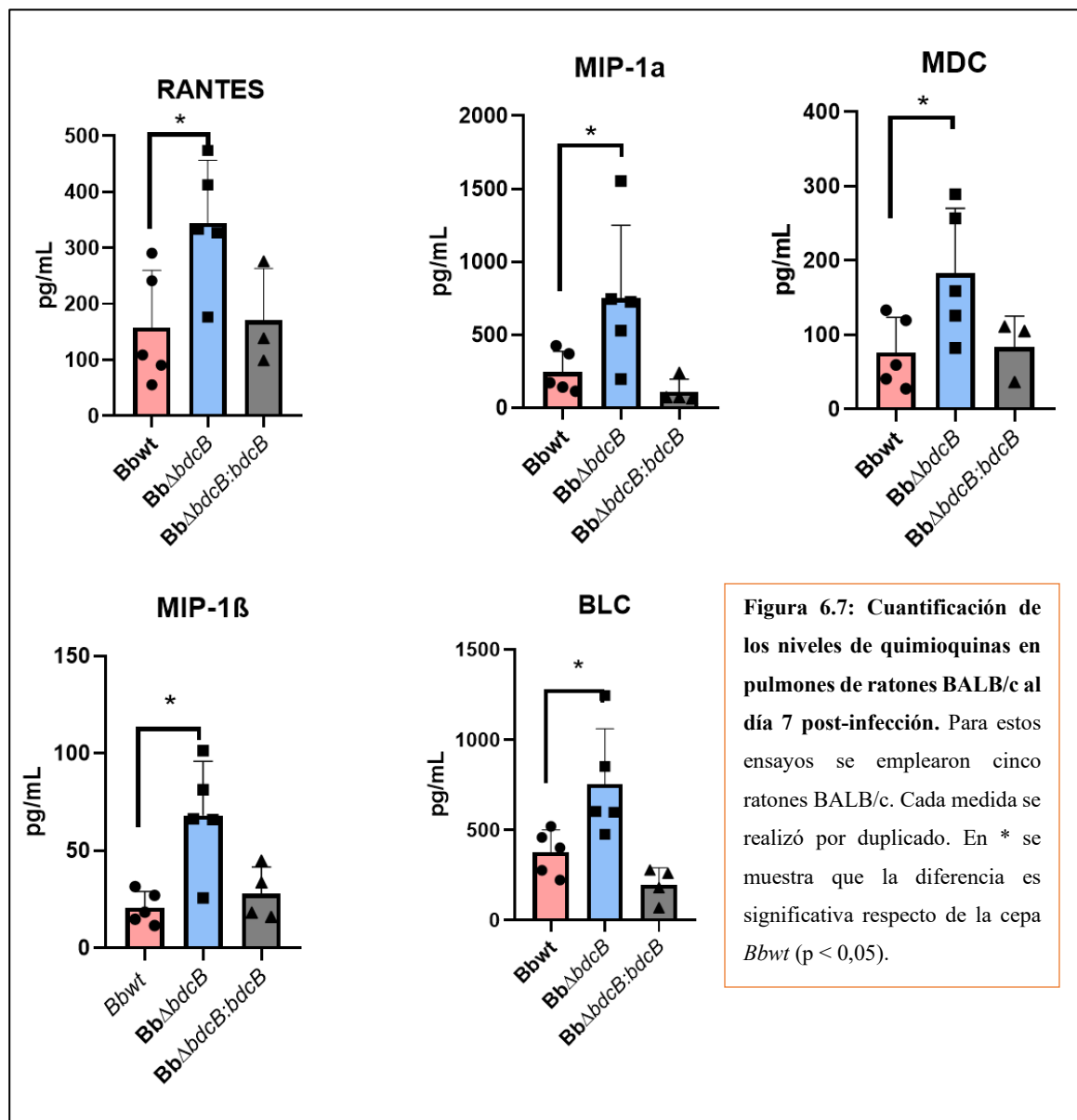
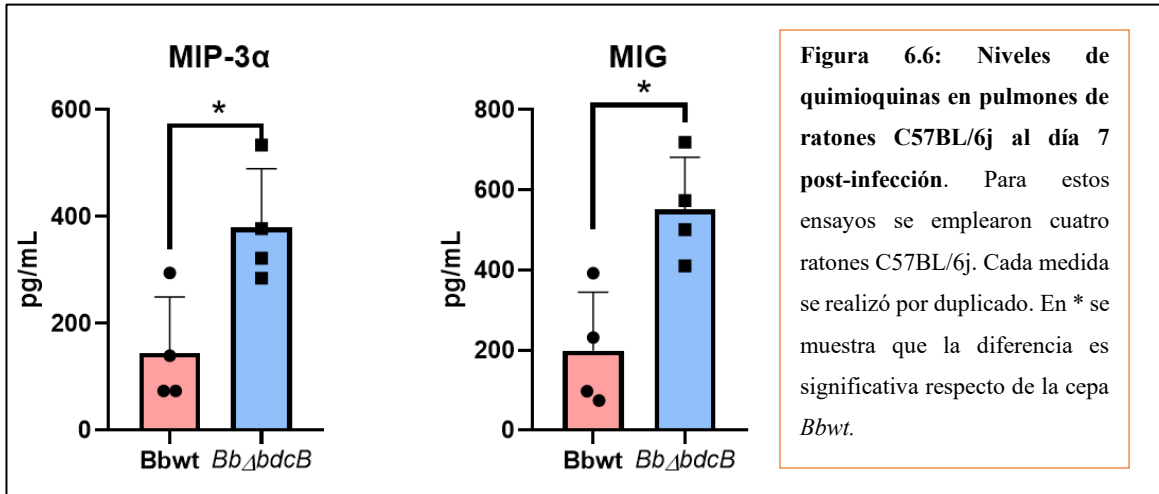
Análisis de la respuesta inmune en pulmón

Mediante la misma estrategia que empleamos antes para analizar la producción de quimioquinas y citoquinas en la cavidad nasal, analizamos también los niveles de quimioquinas y citoquinas en los pulmones de los ratones C57BL/6j y BALB/c infectados con las cepas *Bbwt* y *BbΔbdcB*.

Nuevamente realizamos mapas de colores para mostrar los niveles de todas las quimioquinas y citoquinas analizadas. Los pulmones de los ratones C57BL/6j infectados con la cepa *BbΔbdcB* presentaron mayores niveles de las quimioquinas MIG y MIP-3 α respecto de los pulmones de ratones infectados con la cepa *Bbwt* (figura 6.5 y figura 6.6).

Por otro lado, los pulmones de los ratones BALB/c infectados con la cepa *BbΔbdcB* presentaron niveles de las quimioquinas RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , BLC y MDC significativamente mayores a los de los pulmones infectados con la cepa *Bbwt* (figura 6.5 y figura 6.7).

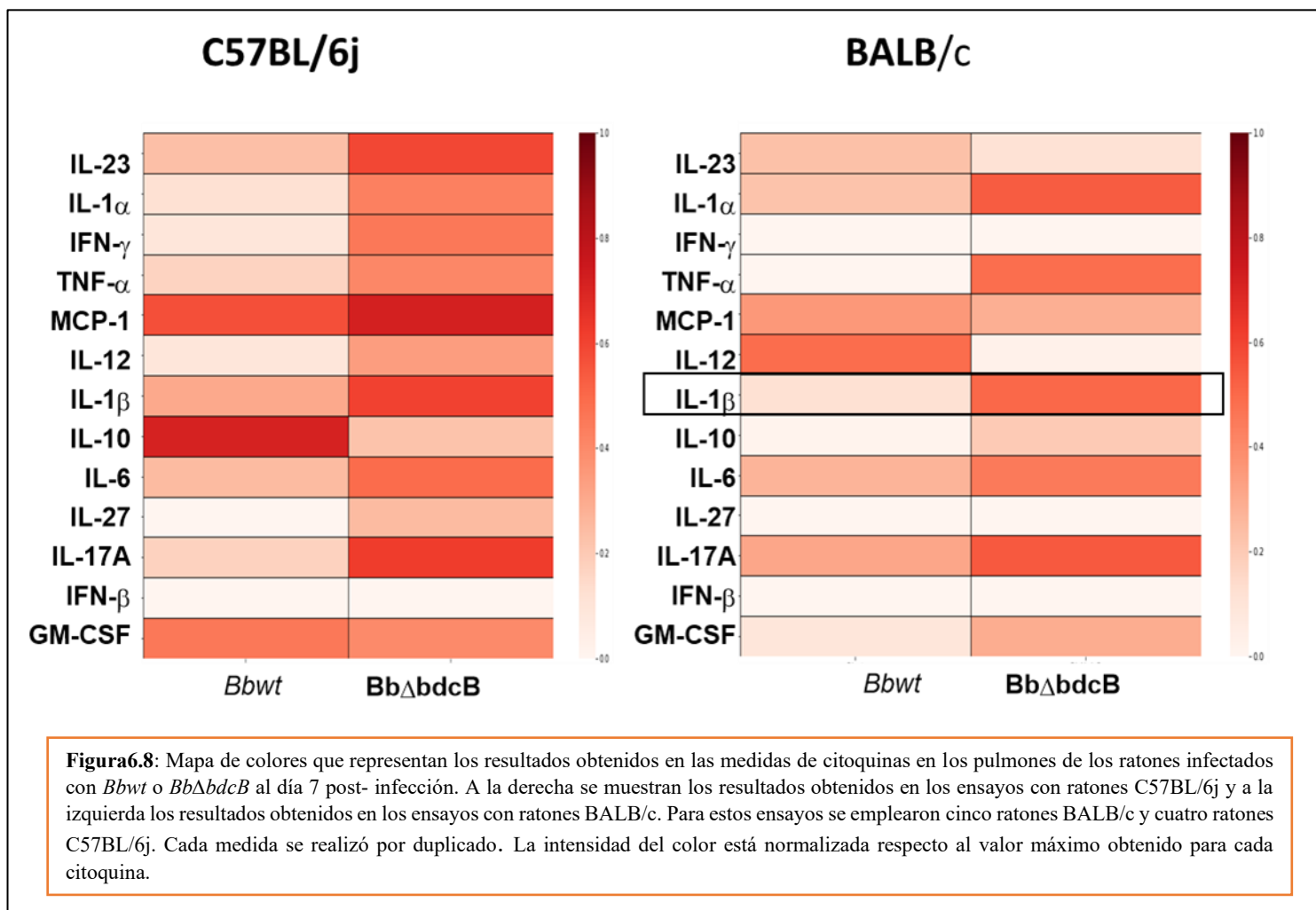




Respecto a las citoquinas analizadas, no observamos diferencias significativas en los niveles obtenidos en los pulmones infectados con la cepa *Bbwt* y *BbΔbdcB* de los ratones C57BL/6j. Sin embargo, los pulmones de los ratones BALB/c infectados con la cepa *BbΔbdcB* presentaron mayores niveles de la interleuquina IL-1β respecto a los pulmones infectados con la cepa *Bbwt* (Figura 6.8 y Figura 6.9).

Con estos resultados podemos concluir que los pulmones de los ratones C57BL/6j infectados con la cepa *BbΔbdcB* no presentaron diferencias significativas en los niveles de citoquinas comparados con los pulmones infectados con la cepa *Bbwt*, mientras que sí hubo un aumento significativo en los niveles de MIG y MIP-3α en los pulmones infectados con la cepa *BbΔbdcB* lo que le permitiría un mayor reclutamiento de las células del sistema inmune al foco inflamatorio.

En el caso de los pulmones de los ratones BALB/c infectados con la cepa *BbΔbdcB* fue aún mayor la cantidad de quimioquinas aumentadas (RANTES, MIP-1α, MIP-1β, BLC y MDC) y se produjo un aumento de los niveles de la citoquina proinflamatoria IL-1β. Por lo tanto, estos resultados sugieren que BdcB estaría participando en la inhibición de la generación de un foco inflamatorio más agudo y la inhibición del reclutamiento de diferentes células del sistema inmune al pulmón.



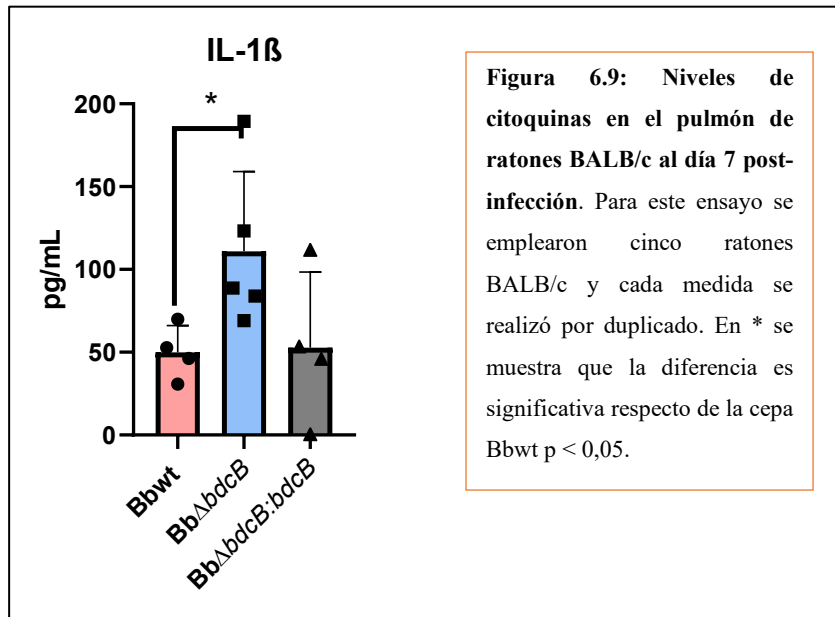


Figura 6.9: Niveles de citoquinas en el pulmón de ratones BALB/c al día 7 post-infección. Para este ensayo se emplearon cinco ratones BALB/c y cada medida se realizó por duplicado. En * se muestra que la diferencia es significativa respecto de la cepa Bbwt $p < 0,05$.

Rol de BdcB en la colonización inicial y en la propagación de *B. bronchiseptica* a las vías respiratorias inferiores

En los ensayos anteriores realizamos un análisis de la infección y de la respuesta inmune empleando inóculos de 1×10^5 UFC en 30 μ l. Este inóculo es ampliamente utilizado en los laboratorios que estudian esta bacteria ya que permite alta reproducibilidad entre ensayos. Sin embargo, esta dosis tan alta no es una dosis que realmente imite una infección natural por esta bacteria. De hecho, la dosis infectiva mínima media (DI50) es menor a 5 UFC para *B. bronchiseptica*^{4,294}. Con estos antecedentes y a fin de analizar si BdcB es importante para la colonización inicial de la cavidad nasal y la posterior propagación de la bacteria a las vías respiratorias inferiores, decidimos realizar un ensayo de colonización empleando un inóculo de dosis baja y bajo volumen (50 UFC en 5 μ l).

Para esto, infectamos ratones C57BL/6j y BALB/c con las cepas *Bbwt*, *BbΔbdcB* y *BbΔbdcB:bdcB* y analizamos el recuento de UFC en la cavidad nasal, tráquea y pulmón al día 3, 7, 14 y 28 para los ratones C57BL/6j y al día 3, 7 y 14 para los ratones BALB/c.

En los ensayos realizados con ratones C57BL/6j, el 100% de ratones inoculados con la cepa *Bbwt* y *BbΔbdcB* presentaron bacterias en al menos uno de los órganos analizados, mientras que, en los ratones infectados con la cepa *BbΔbdcB:bdcB* hubo un 25% de los ratones en los que no se detectaron bacterias en ninguno de los órganos analizados. Por lo que suponemos que solo se infectó el 75% de los ratones inoculados con esta cepa o que la bacteria fue eliminada del huésped a tiempos previos al día analizado.

Capítulo 6

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6.10 (izquierda) donde podemos ver que ya al día 3 los ratones infectados con la cepa *Bbwt* presentaban 1×10^4 UFC/ml en la cavidad nasal y permaneció en este valor incluso hasta el día 28 post-infección. En tráquea, también hubo colonización de la cepa *Bbwt* desde el día 3 hasta incluso el día 28 aunque el recuento de UFC/ml fue menor en tráquea que en la cavidad nasal. La propagación de *Bbwt* a los pulmones se detectó recién al día 7, ya que al día 3 no se detectaron UFC. La infección en los pulmones no perduró en el tiempo, a partir del día 28 nuevamente el recuento de UFC/ml cayó por debajo del límite de detección.

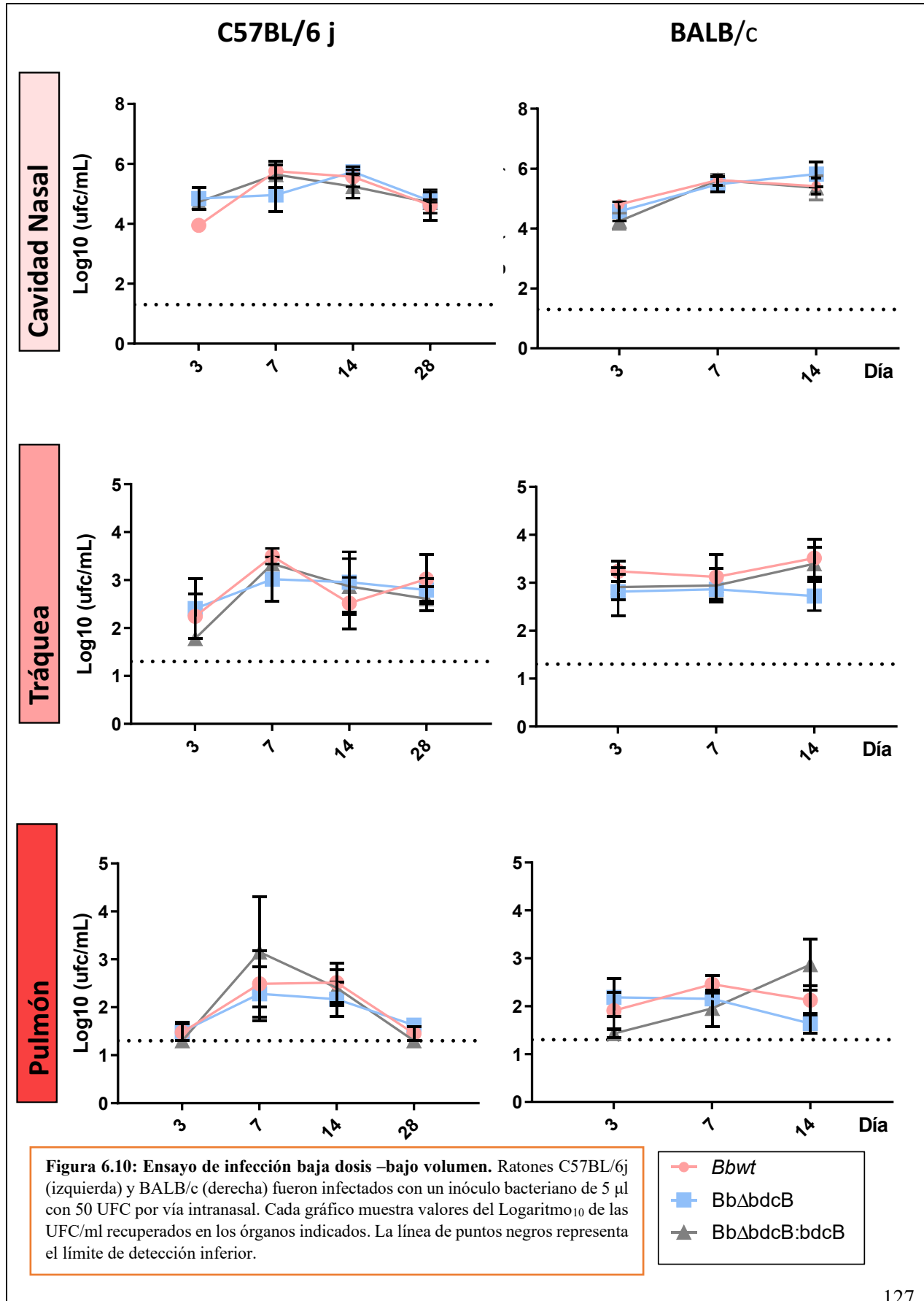
La colonización de las cepas *BbΔbdcB* y *BbΔbdcB:bdcB* fue similar al de la cepa *Bbwt* tanto en la cavidad nasal, tráquea y pulmón en todos los días ensayados.

Respecto al ensayo de colonización empleando ratones BALB/c, el 100% de los ratones inoculados con las tres cepas ensayadas (*Bbwt*, *BbΔbdcB* y *BbΔbdcB:bdcB*) presentaron bacterias en al menos uno de los órganos analizados.

Al día 3 la cepa *Bbwt* fue capaz de infectar y replicarse en la cavidad nasal permaneciendo en ella hasta el día 14 post-infección. En cuanto a la infección en tráquea y en pulmón, también se observó colonización al día 3 aunque el número de UFC/ml fue menor en pulmón que en tráquea. Incluso en el día 14 se detectaron bacterias en ambos órganos (figura 6.10; derecha).

No observamos diferencias significativas en la colonización de la cepa *BbΔbdcB* y *BbΔbdcB:bdcB* respecto de la cepa *Bbwt* en ninguno de los órganos analizados durante el transcurso de los días analizados.

En conclusión, la ausencia de BdcB no afectó la capacidad de la bacteria de colonizar la cavidad nasal y la tráquea de los ratones C57BL/6j y BALB/c en los primeros días post- infección, y tampoco afectó la capacidad de la bacteria de propagarse a los pulmones y colonizarlos.



Discusión

En este capítulo examinamos, en primer lugar, el rol de BdcB durante el proceso de infección realizando ensayos típicos de infección con altas dosis-alto volumen. La infección de los ratones BALB/c y C57BL/6j con la cepa de *B. bronchiseptica* silvestre condujo a la colonización de las vías respiratorias de los ratones de manera similar a lo reportado por otros autores. La cinética de colonización de la cepa *Bbwt* en pulmón, tráquea y nariz mostró un pico máximo en el número de UFC/ml en el día 7 post infección y una disminución paulatina en la carga bacteriana a partir de este día. En el caso de los pulmones, a partir del día 28 no se recuperaron bacterias en este órgano. En cambio, en nariz y tráquea se recuperaron bacterias incluso hasta el día 56 post infección, último punto considerado para estos experimentos. Esta observación confirma resultados previos reportados por muchos otros grupos de investigación que muestran que *B. bronchiseptica* es capaz de superar la fase aguda de la infección y persistir en la cavidad nasal y la tráquea estableciendo infecciones crónicas durante períodos prolongados de tiempo²⁵⁶. Existen al menos tres razones que podrían explicar este comportamiento de *B. bronchiseptica*. En primer lugar, su capacidad de formación de *biofilm* en la cavidad nasal, en segundo lugar, la capacidad de sobrevivir intracelular y, en tercer lugar, el hecho de que *B. bronchiseptica* al igual que *B. pertussis* posee una gran cantidad de mecanismos inmunomoduladores que permiten a la bacteria reducir la intensidad de la respuesta inmune de manera tal de facilitar la colonización del huésped. En el caso de *B. pertussis* se ha informado que la interacción de la FHA, CyaA y el LPS con células dendríticas genera células T reguladoras productoras de la citoquina antiinflamatoria IL-10³⁰²⁻³⁰⁴. Esta citoquina disminuye la inflamación al inhibir la secreción de quimioquinas y citoquinas, así como la expresión de moléculas co-estimuladoras inhibiendo la inflamación requerida para eliminación de este microorganismo. Un trabajo de Skinner y colaboradores ha demostrado también, que la interacción del SST3 de *B. bronchiseptica* con células presentadoras de antígeno induce la generación de esplenocitos productores de IL-10 conduciendo también a una inmunosupresión y la permanencia de la bacteria en el huésped²⁷⁸. De hecho, la ausencia del SST3 no afecta la colonización de la bacteria en la cavidad nasal y en los pulmones de los ratones, pero sí afecta la colonización de la tráquea al día 35 post-infección tanto en la infección de ratones BALB/c como en ratones C57BL/6j²⁷⁹.

Los ensayos de colonización con ratones BALB/c y C57BL/6j no mostraron diferencias significativas en la capacidad de colonización de la cepa *Bbwt* respecto de la cepa *BbΔbdcB*. Dada la importancia del SST3 durante el proceso de infección, en particular en la colonización de la tráquea a tiempos relativamente largos, era de esperar que la delección de BdcB, inhibidor de la expresión del SST3 (capítulo 5) tuviera un impacto en la capacidad de la colonización de *B. bronchiseptica*. Este resultado podría sugerir que, o bien en estas condiciones experimentales BdcB no tiene un rol protagónico en el proceso de infección o bien que el diseño experimental no fue suficientemente potente para poner en evidencia su importancia.

Con el objetivo de avanzar en la descripción del rol de BdcB durante el proceso de infección de *B. bronchiseptica* decidimos analizar la producción de citoquinas y quimioquinas tanto en la nariz como en los pulmones de los ratones infectados al día 7 post-infección. En este ensayo pudimos observar que la infección de ratones BALB/c con la cepa *BbΔbdcB* conduce a una mayor producción de la interleuquina pro-inflamatoria IL-1 β tanto en pulmón como en la cavidad nasal y un aumento significativo de diversas quimioquinas como RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , BLC y MDC en los pulmones de los ratones infectados. Si bien observamos valores altos de quimioquinas en ratones C57BL/6j infectados con la cepa *BbΔbdcB*, estos no eran significativamente diferentes. Esto puede deberse a que se emplearon solo cuatro ratones para este ensayo, mientras que para los ensayos con ratones BALB/c se emplearon cinco.

En los últimos años se ha demostrado que las quimioquinas desempeñan un papel en la defensa del huésped contra las bacterias en numerosos modelos de infección pulmonar en ratones, incluidos *Klebsiella pneumoniae*³⁰⁵, *Streptococcus pneumoniae*³⁰⁶, *P. aeruginosa*³⁰⁷, *Haemophilus influenzae*³⁰⁸, y *Legionella pneumophila*³⁰⁹. En estos casos, el aumento en los niveles de quimioquinas conduce a una disminución en las cargas bacterianas. Por otro lado, en las infecciones con otros microorganismos como por ejemplo con *B. bronchiseptica*, se ha observado que la producción de las quimioquinas y citoquinas presentan una inducción máxima entre las 6 y las 48 horas post- infección, seguida de una disminución a niveles basales a los 5 días. El número total de leucocitos y linfocitos aumenta a los 3 días, pero vuelve a estar cerca de la línea de base a los 7 días. La disminución de los niveles de leucocitos entre los días 5 y 7 ocurre en un momento en que el número de bacterias viables en el pulmón aún no ha comenzado a disminuir³¹⁰. Como se describe anteriormente, los factores de virulencia específicos del microorganismo, como FHA, CyaA, LPS y el SST3 pueden influir en la cinética y la magnitud de algunas respuestas de quimioquinas que participarían en la modulación de la respuesta inmune³⁰²⁻³⁰⁴. En base a estos resultados podríamos considerar dos escenarios que explican estas observaciones. La mayor producción de quimioquinas y citoquinas en los pulmones infectados con *BbΔbdcB* al día 7 post-infección podría deberse a que la delección de BdcB: **(I)** induce una inflamación más prolongada en el tiempo o **(II)** genera un retraso en la activación de la respuesta inmune por parte del huésped. Cualquiera de estos dos escenarios podría explicar la observación de un mayor nivel de citoquinas y quimioquinas al día 7 post-infección en comparación a la cepa salvaje. Con el objetivo de comenzar a desentrañar frente a cuál de las dos opciones nos encontramos sería interesante analizar en un futuro cómo es la respuesta inmune en tiempos previos y posteriores a los 7 días para tener una visión más amplia de lo que está ocurriendo. Mas allá de esta propuesta, el resultado descrito en los párrafos anteriores pone de manifiesto un rol importante de la diguanilato ciclasa BdcB en la modulación de la respuesta inmune del huésped.

En los ensayos de medidas de citoquinas y quimioquinas identificamos que los niveles de la quimioquina RANTES están significativamente aumentados en pulmones de ratones infectados con *BbΔbdcB* en comparación a los infectados con bacterias silvestres. La quimioquina RANTES principalmente producida por las células T y monocitos, induce el reclutamiento de linfocitos T, eosinófilos y basófilos hacia el sitio de infección³¹¹. Estos resultados coinciden con los resultados publicados por Nicholson y colaboradores en el que comparan los niveles de la quimioquina RANTES en los pulmones de cerdos infectados con la cepa *B. bronchiseptica* silvestre y una cepa con el SST3 deletado. En este trabajo, demuestran que la infección con cepas deletadas en el SST3 presentan niveles bajos de la quimioquina RANTES respecto de la cepa silvestre³¹². Por otra parte, entre las citoquinas cuantificadas, la única que presentó diferencias significativas fue IL-1 β . Esta citoquina se encuentra aumentada en los ratones infectados con *BbΔbdcB* respecto a la cepa silvestre. Un trabajo previo de nuestro grupo describió que los ratones infectados con *Bbpbdca* (altos niveles de c-di-GMP en el citosol) presentaron una respuesta inmune menor respecto del control, caracterizada por la disminución significativa de varias citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-5, IL-1 β , IFN- γ y TNF- α)²⁴⁰. La diferencia encontrada en este trabajo de tesis va en el mismo sentido, relacionando la respuesta inflamatoria con el SST3. *Bbpbdca* presenta disminuída la expresión de SST3, y consecuentemente, induce una menor respuesta inflamatoria. *BbΔbdcB* tiene una mayor expresión de SST3, y presenta en IL-1 β , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , BLC y MDC - una mayor respuesta inflamatoria. Por otra parte, la diferencia en la cantidad de citoquinas diferencialmente detectadas en uno y otro ensayo son también coincidentes con la condición de las cepas utilizadas. *Bbpbdca* presenta una sobreexpresión de una diguanilato cilasa, en una situación alejada de lo fisiológico, mientras que *BbΔbdcB* presenta la delección de una única diguanilato ciclasa de las diez con potencial actividad que presenta el genoma de *B. bronchiseptica*. Respecto a la fisiopatología de los animales, los pulmones de los ratones infectados con *Bbpbdca* presentaron una clara menor inflamación²⁴⁰. Estos resultados son coincidentes con los antes mencionados realizados en cerdos: los mutantes en el SST3 presentaron lesiones menos extensas en términos de necrosis, hemorragia o fibroplasia. Sería interesante analizar en un futuro, mediante ensayos histopatológicos, si se correlaciona la mayor respuesta inmune de los ratones a la cepa *BbΔbdcB* con un mayor daño en el pulmón, posiblemente debido a una mayor expresión del SST3.

Los primeros eventos en la colonización de un nuevo huésped son aspectos críticos con un impacto enorme sobre etapas más avanzadas del proceso de infección como son la transmisión, la propagación de la enfermedad y la patogénesis, pero la escala microscópica en la que ocurren estos eventos hace que sean difíciles de observar y medir. A menudo, se utilizan dosis anormalmente altas para investigar enfermedades infecciosas en modelos experimentales para lograr la reproducibilidad, con muy poca consideración de cómo esto afecta los mecanismos de colonización inicial, como la adherencia, la evasión inmune, la

competencia con otras bacterias y la propagación de la bacteria a las vías respiratorias bajas. A fin de evaluar el rol de BdcB en estos procesos, en la última parte del capítulo, realizamos ensayos de colonización empleando una estrategia de inoculación de dosis baja y bajo volumen. Los ratones son huéspedes naturales de *B. bronchiseptica* y presentan una dosis infectiva media de 5 UFC⁴⁴⁻⁴⁸. Sin embargo, la implementación de una dosis tan baja como 5 UFC puede conducir a que no todos los ratones se infecten. A fin reducir esto, en lugar de infectar con 5 UFC seleccionamos una dosis de 50 UFC para realizar este análisis. Aun así, en los ensayos realizados con ratones C57BL/6j infectados con la cepa *BbΔbdcB:bdcB* hubo un 25% de los ratones en los que no se detectaron bacterias en ninguno de los órganos analizados. Por lo tanto, suponemos que solo se infectó el 75% de los ratones inoculados con esta cepa. Es importante mencionar que cuando se hizo el recuento del inóculo de esta bacteria había algunas en la fase avirulenta. Como se describe en la introducción general, en esta fase, la bacteria no expresa los factores de virulencia que son requeridos para una colonización exitosa, y la bacteria es rápidamente eliminada del huésped^{48,135,136}.

Al analizar y comparar la colonización entre la cepa *BbΔbdcB* y la cepa Bbwt tanto en ratones BALB/c como C57BL/6j, no observamos diferencias significativas. Ambas cepas fueron capaces de colonizar la cavidad nasal y la tráquea al día 3 y propagarse a los pulmones en los días subsiguientes. Con lo cual, en estos ensayos demostramos que la ausencia de BdcB tampoco afecta la capacidad de colonización de la bacteria en las etapas iniciales de la infección.

En conclusión, si bien BdcB no afecta la capacidad de *B. bronchiseptica* de colonizar las vías respiratorias de los ratones, sí presenta un rol en la modulación de la respuesta inmune de este huésped. Hasta la fecha han sido descritos diversos factores implicados en la modulación de la respuesta inmune, sin embargo, no se conocía ninguno mediado por c-di-GMP.

Capítulo 7: Conclusiones generales

Conclusiones generales

Las *Bordetellas* clásicas son patógenos capaces de colonizar las vías respiratorias en humanos y otros mamíferos^{1,4,22}. Para poder llevar a cabo una colonización exitosa, evadir la respuesta inmune y permanecer dentro del tracto respiratorio de los animales estas bacterias emplean una serie de factores de virulencia altamente caracterizados, como FHA, CyaA, PRN y SST3, entre otros^{4041,42}. Estos factores de virulencia están regulados por el sistema de dos componentes BvgAS: Cuando el sistema está activo, BvgA es fosforilada y activa la expresión de los factores de virulencia. Esta fase en la que el sistema BvgAS se encuentra activo y se expresan los factores de virulencia es conocida como fase virulenta. La misma ha sido definida como la fase necesaria y suficiente para establecer una colonización^{48,135,136}. En los últimos años se ha visto que la regulación de estos factores de virulencia es aún más compleja, y otros sistemas de regulación pueden participar en la regulación de estos factores y superponerse con la regulación de este sistema en respuesta a las diversas señales del entorno del huésped a la que está sometida la bacteria^{137,138}^{140,141}. Adicionalmente, componentes regulados negativamente por el sistema BvgAS se expresan *in vivo* pudiendo tener un rol importante en la persistencia de la bacteria dentro del huésped^{159,313,314}. Comprender con exactitud los mecanismos que contribuyen a la patogénesis de estas bacterias en el huésped es importante para mejorar las estrategias preventivas.

En este contexto, nuestro grupo de trabajo ha iniciado, en el año 2013, el estudio del sistema de señalización mediado por c-di-GMP en *B. bronchiseptica*. Este segundo mensajero casi ubicuo en bacterias ha sido implicado en la regulación de varios fenotipos relacionados con la virulencia en diversos patógenos. Sin embargo, hasta esa fecha no se conocía el rol de este mensajero en la fisiología de *B. bronchiseptica*. A partir de los estudios llevados a cabo pudimos describir que el c-di-GMP regula la formación de *biofilm* y la movilidad en *B. bronchiseptica*¹⁷¹ y hemos identificado proteínas específicas involucradas en estos fenotipos. Por ejemplo, hemos descrito que la adhesina BrtA es importante para la formación de *biofilm* y su localización en la membrana de la bacteria depende de las proteínas LapG y LapD, y las diguanilato ciclasas específicas que activan el sistema como BdcA y BB2626¹⁷⁵(Tesis N. Ambrosi; 2018). Además, identificamos a la diguanilato ciclasa BdcA la cual participa en la regulación de la movilidad de la bacteria²³⁹. Análisis de sobreexpresión de BdcA nos permitió conocer que este segundo mensajero, además de regular la movilidad y la formación de *biofilm* de *B. bronchiseptica*, también participa en la represión de componentes del SST3²⁴⁰. Tanto la formación de *biofilm* como el SST3 son importantes para la colonización y la persistencia de la bacteria dentro del huésped. Por lo tanto, podemos inferir que sistemas de señalización a través de este segundo mensajero c-di-GMP podrían tener un rol *in vivo*. Nuestro grupo de trabajo se ha propuesto seguir ampliando el conocimiento del rol de este sistema de señalización en fenotipos implicados en la patogénesis de la bacteria y comprender de qué manera cada una de las enzimas implicadas en el metabolismo de c-di-GMP participa en los fenotipos relacionados a la patogénesis de la bacteria.

En este trabajo de Tesis Doctoral nos enfocamos en analizar el rol de una diguanilato ciclasa específica, la proteína BdcB. El objetivo general de la Tesis fue caracterizar a BdcB y analizar su rol en fenotipos relacionados a la patogénesis de *B. bronchiseptica*.

Mediante análisis bioinformáticos encontramos que BdcB está presente exclusivamente dentro del grupo de las *Bordetellas* clásicas. Esta diguanilato ciclasa presenta un dominio GGDEF, implicado en la síntesis de c-di-GMP y una región desordenada que se une al dominio GGDEF a través de un motivo *coiled coil*. Con los estudios realizados en el capítulo 2 de análisis *in silico*, de expresión heteróloga en *P. fluorescens*, de movilidad y de formación de *biofilm* en *B. bronchiseptica* empleando diferentes construcciones de la proteína entera, delecionada en su extremo N-terminal y mutada en su sitio activo pudimos determinar que BdcB es una diguanilato ciclasa activa y tanto su región N-terminal como su sitio catalítico son importantes para su actividad.

La flexibilidad de la región desordenada podría permitirle a BdcB reconocer diversos ligandos y/o interactuar con otros componentes celulares y regular así su actividad a través de cambios conformacionales. Teniendo en cuenta que las diguanilato ciclasas deben dimerizar y posicionar correctamente los dominios GGDEF para poder sintetizar una molécula de c-di-GMP, podemos proponer dos mecanismos posibles de regulación post-transcripcional de BdcB: (I) que BdcB esté presente como monómero y frente a la unión de un ligando a la región N-terminal o su interacción con otros componentes celulares favorezca la dimerización de BdcB para alcanzar su estado catalíticamente activo, o (II) que BdcB esté presente como dímero inactivo y la unión a un ligando produzca cambios conformacionales que posicionen a los dominios GGDEF correctamente para permitir la síntesis de c-di-GMP.

La regulación post-transcripcional de BdcB explicaría por qué no observamos una activación a nivel transcripcional dentro del macrófago. Durante la vida intracelular, al momento de requerir mayores niveles de c-di-GMP, BdcB ya presente en el citoplasma bacteriano podría activarse a través de cambios conformacionales inducidos por la unión a un ligando. También nos permitiría explicar por qué no observamos un aumento en la formación de *biofilm* cuando sobreexpresamos a BdcB en la fase virulenta, siendo que hay otras diguanilato ciclasas que sí son capaces de aumentar la formación de *biofilm* en esta fase. Dependiendo de la fase de virulencia de la bacteria podrían estar presentes ciertas moléculas y/o proteínas y otras no, lo que favorecería la interacción con éstas en una fase y con otras en una diferente, y, por tanto, en cada caso favorecer o no la actividad de BdcB.

Una característica distintiva de *B. bronchiseptica* es su capacidad de permanecer dentro del huésped por períodos prolongados de tiempo. Entre los mecanismos descritos como importantes en la patogénesis de *Bordetella* podemos destacar la capacidad de formación de *biofilm* en el tracto respiratorio y la de la vivir intracelularmente dentro de células del sistema inmune como células dendríticas, macrófagos y células

epiteliales^{146,166 150–153}. Como se mencionó en los párrafos anteriores, la formación de *biofilm* es uno de los fenotipos que está regulado por c-di-GMP. Así como en otras bacterias la síntesis de c-di-GMP favorece la formación de *biofilm* en *B. bronchiseptica*. A partir de los ensayos de formación de *biofilm* realizados en el capítulo 3 pudimos demostrar que BdcB participa en la formación de *biofilm* en la fase intermedia de manera dependiente de la superficie que emplee. La regulación del *biofilm* en *B. bronchiseptica* por parte del sistema Lap también la hemos observado precisamente en esta fase. Sin embargo, la sobreexpresión de BdcB en el mutante LapD sigue provocando un aumento en la formación de *biofilm* (Tesis Ambrosis N; 2018). Por lo tanto, es posible especular que además del sistema Lap, existirían otros sistemas sensibles a la regulación por c-di-GMP que tengan importancia en la formación de *biofilm* en esta fase los cuales podrían estar controlados por BdcB.

BdcB podría participar en la regulación de componentes de la matriz extracelular del *biofilm* como por ejemplo exopolisacáridos. Hasta la fecha solo se ha descrito la presencia de un solo exopolisacárido en *B. bronchiseptica*, el PNAG. Este exopolisacárido también está presente en otras bacterias. Su producción es iniciada por el complejo formado por PgaC y PgaD el cual sintetiza y transporta PNAG a través de la membrana citoplasmática. Seguidamente, PgaA y PgaB lo unen y lo translocan a través del espacio periplásmico. La síntesis y exportación de PNAG en otras bacterias Gram negativas, por ejemplo en *E. coli*, está regulado por el sistema de señalización por c-di-GMP, el cual induce la síntesis de este exopolisacárido al unirse directamente a PgaC y PgaD^{180–182,186}. Tanto PgaA, PgaB como PgaC y PgaD están presentes en *B. bronchiseptica*, sin embargo, no ha sido estudiada la participación de c-di-GMP en la regulación de este sistema. Proponemos que este podría ser un posible mecanismo de regulación mediado por c-di-GMP en *B. bronchiseptica*, en el cual BdcB podría estar participando. Otra posibilidad es que BdcB participe en la expresión de algún exopolisacárido aún no caracterizado o en la regulación de la expresión o localización de adhesinas en la membrana a través de mecanismos similares o alternativos al del sistema Lap.

Dado que la capacidad de formación de *biofilm* ha sido descrita como una característica que le permite a la bacteria persistir dentro del tracto respiratorio de los huéspedes, hipotetizamos que BdcB podría ser un factor importante en la persistencia de *B. bronchiseptica* a tiempos largos de colonización. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que la delección de *bdcB* no afecta la capacidad de *B. bronchiseptica* de persistir en el tracto respiratorio de los ratones BALB/c incluso hasta el día 56 post-infección. Este resultado plantea al menos dos posibilidades. En primer lugar, BdcB podría estar participando en un mecanismo que le permita a la bacteria formar *biofilm in vivo*, pero la ausencia de esta proteína podría ser compensada por la actividad de otra u otras diguanilato ciclasas. Por otro lado, dado que el rol de BdcB en la formación de *biofilm in vitro* fue dependiente de la superficie empleada, cabe la posibilidad de que BdcB

no sea importante para la formación de *biofilm* sobre las regiones de tracto respiratorio en las que *Bordetella* es capaz de persistir por períodos prolongados de tiempo.

Hasta hace poco, las especies de *Bordetella* se consideraban exclusivamente patógenos respiratorios extracelulares³¹⁵ pero, los estudios *in vitro* han demostrado que *Bordetella* puede ser capaz de sobrevivir intracelularmente¹⁵⁰⁻¹⁵³. Incluso, hay informes de la recuperación de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* del lavado bronquiolar de ratones, células dendríticas de la cavidad nasal murina y macrófagos alveolares de pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana^{316,317}, lo que sugiere que la supervivencia intracelular es un mecanismo empleado por *B. bronchiseptica* durante la infección.

Mediante ensayos de sobrevivencia intracelular realizados en el capítulo 4 vimos que el mutante en *bdcB* no es recuperado dentro de los macrófagos 4 horas post infección. Este fenotipo fue específico del mutante en *bdcB* ya que mutantes en otras proteínas implicadas en el metabolismo de c-di-GMP sí fueron recuperadas dentro de los macrófagos en los tiempos ensayados. Este resultado destaca un rol específico e importante de BdcB en dicho fenotipo. En base a este resultado nos propusimos seguir profundizando en el rol de BdcB en la interacción con los macrófagos. A partir de los resultados de citotoxicidad llevados a cabo en el capítulo 5 vimos que la ausencia de BdcB le confería una mayor citotoxicidad a la bacteria, y por lo tanto una mayor muerte de las células eucariotas. *B. bronchiseptica* presenta una serie de factores de virulencia que le permiten llevar a cabo la infección. En este trabajo demostramos que esta diguanilato ciclasa regula la expresión de uno de ellos, el SST3. Este sistema es un importante factor de virulencia de la bacteria que le permite inyectar efectores dentro de las células del huésped y modular así la respuesta inmune. A su vez, el SST3 le confiere citotoxicidad a la bacteria frente a distintas células de sistema inmune. Se ha descrito que la ausencia de BteA o Bsp22, dos proteínas del SST3, disminuyen marcadamente la citotoxicidad de la bacteria^{110,282}. Tanto Bsp22 como BteA están aumentadas en el mutante *bdcB*. En un trabajo previo en nuestro grupo de investigación se describió que el aumento no fisiológico de c-di-GMP (por sobreexpresión de BdcA) conduce a una represión del SST3²⁴⁰. En este trabajo pudimos realizar un paso más e identificar a una diguanilato ciclasa específica implicada en el control de este sistema.

Se ha demostrado que la expresión del SST3 limita la supervivencia intracelular de *B. bronchiseptica* durante la infección¹⁵⁹. De hecho, se ha visto que *B. bronchiseptica* dentro de los macrófagos suprime el SST3 y activa la expresión de los factores implicados en la respuesta a estreses. En el capítulo 4 demostramos que los altos niveles de c-di-GMP, independientemente de la naturaleza de la diguanilato ciclasa, permite a *B. bronchiseptica* resistir a pH ácidos. En este trabajo pudimos asignar a BdcB el rol fisiológico de participar en la regulación de c-di-GMP que permite resistir a estas condiciones de pH ácido. El hecho de que la delección de una sola diguanilato ciclasa permita observar una disminución de la

resistencia a pH indica la importancia de BdcB en este fenotipo. De acuerdo con estos resultados, podemos hipotetizar que BdcB podría actuar directa o indirectamente reprimiendo la expresión de ciertos genes, tales como *bteA* y *bsp22*, y activando otros implicados en la resistencia a estrés ácido, permitiendo la sobrevivencia intracelular de la bacteria y la permanencia dentro del huésped.

Sería interesante conocer en un futuro si BdcB regula también otros genes, y cuál es el mecanismo por el cual BdcB regula la expresión a nivel transcripcional de los genes del SST3. Dado que los niveles de expresión de los reguladores del SST3, genes de locus *btr*, no se vieron afectados en la cepa delecionada en *bdcB* (capítulo 5), hipotetizamos que la regulación de BdcB sobre los genes de los componentes del SST3 se ejerce a través de mecanismos independientes o a través de una regulación postranscripcional de los reguladores Btr.

Considerando que BdcB regularía la expresión de genes mediante la síntesis de c-di-GMP se pueden plantear varios mecanismos posibles de regulación, no excluyentes entre sí, en función de los receptores de c-di-GMP conocidos.

Modelo A: El c-di-GMP sintetizado por BdcB se podría estar uniendo a un factor transcripcional induciendo su activación. Este mecanismo de regulación ha sido estudiado en *E. coli* en cual la diguanilato ciclasa DgcM sintetiza c-di-GMP que se une al factor de transcripción MlrA y lo activa. En este sistema también participa la fosfodiesterasa PdeR que se une e inhibe tanto a DgcM como a MlrA. Cuando PdeR une y degrada c-di-GMP provisto por otra diguanilato ciclasa, DgcM y MlrA se liberan, DgcM se activa y activa a MlrA^{237,238}. En base a este sistema podríamos proponer un mecanismo similar en el que BdcB sintetice c-di-GMP y active a un regulador transcripcional.

En *B. pertussis*, se ha propuesto un mecanismo de regulación dependiente de c-di-GMP para el regulador de respuesta RisA. RisA, como mencionamos en la introducción general, activa los genes de avirulencia y tiene un rol importante en la sobrevivencia intracelular de *B. bronchiseptica*. El modelo propone que RisA sería capaz de unir c-di-GMP y dependiendo si RisA tiene unido o no c-di-GMP regularía uno u otro grupo de genes^{137,261}. Este modelo, diseñado por el grupo de Stibitz, surge a partir de estudios transcriptómicos comparativos entre cepas delecionadas en *risA* ($\Delta risA$) y cepas doble mutantes $\Delta risA \Delta bvgR$. BvgR es una proteína con un dominio EAL característico de las enzimas fosfodiesterasas. En base a estos ensayos proponen que en presencia de BvgR la bacteria presenta “bajos niveles de c-di-GMP” y RisA activa y reprime un determinado grupo de genes. Mientras que en ausencia de BvgR, la bacteria presenta “altos niveles de c-di-GMP” y RisA une c-di-GMP para regular la expresión de otro grupo de genes. Si bien este modelo ha sido publicado en algunas revistas científicas^{137,139,261}, BvgR no conserva los aminoácidos esenciales para catalizar la degradación de c-di-GMP, por lo que probablemente no tenga actividad fosfodiesterasa. A su vez, tampoco ha sido demostrada la capacidad de RisA de unir c-di-GMP.

Con lo cual, es probable que exista una relación entre RisA y BvgR pero deberá realizarse un estudio más robusto que demuestre la relación entre RisA y c-di-GMP para poder inferir con mayor certeza la presencia de guanylatos ciclases como BdcB involucradas con el factor de transcripción RisA.

Como hemos mencionado, BvgR presenta un dominio EAL degenerado. Esto sugiere que BvgR no podría ser una fosfodiesterasa activa, pero no podemos descartar que sea capaz de unir c-di-GMP. Resultados de una Tesis Doctoral desarrollada en nuestro laboratorio, demostraron que BvgR regula positivamente la expresión del SST3, y la ausencia de esta proteína genera una disminución de la respuesta inmune del modelo de infección murino (Tesis Guitierrez P: 2021). Un rol de BvgR opuesto a lo observado con BdcB. Con lo cual podría plantearse dentro de nuestro modelo a BvgR inhibiendo a BdcB. De manera análoga al sistema PdeR, DgcM y MlrA de *E. coli*, BvgR, inhibiría tanto a BdcB como a un factor transcripcional. En ausencia de BvgR, o BvgR unido a c-di-GMP, el complejo BdcB-factor transcripcional se activaría activando y/o reprimiendo genes.

Modelo B: El mecanismo de regulación del SST3 es muy complejo. La expresión del sistema está regulada por componentes de la sangre, CO₂, hierro y glutamato entre otros³¹⁸. Además de las regulaciones transcripcionales descritas a cargo del sistema de dos componentes BvgAS se le suman regulaciones postraduccionales producto de diversas interacciones entre reguladores. El factor sigma BtrS, que activa la transcripción del locus *bsc*, es regulado por BtrA, un factor anti-sigma: la unión de BtrA a BtrS impide que este último se una a la zona promotora para activar la expresión del operón que codifica para algunos de los componentes del SST3^{108,282}. El complejo de proteínas BtrW/V/U es necesario para la correcta secreción de los factores del SST3³¹⁹. Como mencionamos anteriormente, el c-di-GMP es capaz de unirse como efector alostérico a diversas proteínas. Es posible plantear un segundo modelo en el que BdcB participe regulando la expresión de los genes del SST3 alterando las interacciones descritas.

Modelo C: En *B. pertussis* se ha descrito que la chaperona Hfq está implicada en la regulación del SST3 en esta bacteria. Se ha descrito que la ausencia de esta chaperona disminuye la expresión de genes del SST3 tales como BteA y Bsp22 pero no afecta la expresión de los reguladores *btr* de este sistema^{113,284}. No se conoce aún de qué manera se lleva a cabo esta regulación en *B. pertussis*.

Esta chaperona, en otras bacterias, participa en numerosos fenotipos, como la regulación del crecimiento bacteriano, la quimiotaxis y la movilidad, la formación de *biofilm* y la expresión del factor de virulencia, similares a los fenotipos regulados por c-di-GMP. De hecho, se han descrito diversas maneras en la que estos dos sistemas de regulación se relacionan²⁸⁶. Hfq puede regular las enzimas del metabolismo de c-di-GMP a nivel transcripcional, post-transcripcional, traduccional y post-traducciona.

Dada la notoria relación entre esta chaperona y el sistema de señalización mediado por c-di-GMP en otras bacterias podríamos plantear un tercer modelo que vincule a BdcB con Hfq. La delección de Hfq no afectó la transcripción de BdcB^{113,284} por lo que podría proponerse una relación entre estas dos proteínas a nivel traduccional o post-traduccional. Podría considerarse que Hfq inhiba la traducción de BdcB, que Hfq interactúe con el monómero o el dímero de BdcB inhibiéndolo, o que haya algún otro mecanismo aún no conocido que las vincule.

Modelo D: Dentro de los receptores de c-di-GMP descritos hasta el momento se encuentran los *riboswitch*. Estas secuencias de ARN no codificantes localizadas en el extremo 5' del ARNm, son capaces de unir c-di-GMP e inducir un cambio en la transcripción de los genes *downstream*²³⁰. Con lo cual, podríamos plantear un cuarto modelo en el que el c-di-GMP sintetizado por BdcB sea ligando de un *riboswitch* que controle la expresión de algún factor de transcripción.

Analizar el rol de BdcB en la formación de *biofilm* y la sobrevivencia intracelular nos acerca un poco más a comprender de qué manera estas bacterias logran persistir dentro del huésped. La existencia de estos fenotipos en la persistencia tiene un gran impacto en el diseño de estrategias terapéuticas y/o preventivas eficaces contra esta enfermedad. Por este motivo, en este trabajo de Tesis se profundizó el estudio de los mecanismos que podrían involucrar a BdcB para permitir a *B. bronchiseptica* establecerse en un nicho de persistencia.

Por último, resultó interesante observar que la mutación de *bdcB* generó un desbalance en la producción de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en los sobrenadantes de los cultivos celulares (capítulo 5) y una mayor producción de quimioquinas e IL-1 β en los pulmones de los ratones infectados (capítulo 6). Esta mayor respuesta inmune sigue apoyando nuestro modelo en el cual BdcB suprime el SST3. Incluso, BdcB podría estar regulando la expresión de otros factores bacterianos implicados en la modulación de la respuesta inmune. Si bien la mutación del gen *bdcB* no afectó la capacidad de *B. bronchiseptica* de colonizar el modelo de infección murino, sí afectó la respuesta inmune generada. Una hipótesis posible es que BdcB participe en la supresión de la respuesta inmune y de esta manera permita la permanencia de la bacteria en el tracto respiratorio del ratón.

En suma, estos resultados ponen en evidencia la participación del c-di-GMP y en particular de BdcB en las complejas vías de señalización que regulan la expresión de al menos el factor de virulencia SST3, y esta regulación puede ser importante en algún momento del proceso infeccioso de este patógeno.

Capítulo 8: Materiales y métodos

Cepas, condiciones de crecimiento y almacenamiento

Pseudomonas fluorescens

Cepas. Las cepas de *P. fluorescens* 01 utilizadas en este trabajo se detallan en la siguiente tabla:

Cepa	Descripción	Referencia
<i>Pf</i> Δ4DGC	<i>Pf</i> ΔwspRΔgcbAΔgcbBΔgcbC	255
<i>Pf</i> Δ4DGCpMQ72	<i>Pf</i> ΔwspRΔgcbAΔgcbBΔgcbC pMQ72	255
<i>Pf</i> Δ4DGCp <i>gcbC</i>	<i>Pf</i> ΔwspRΔgcbAΔgcbBΔgcbC pMQ72- <i>gcbC</i>	255
<i>Pf</i> Δ4DGCp <i>bdcB</i>	<i>Pf</i> ΔwspRΔgcbAΔgcbBΔgcbC pMQ72- <i>bdcB</i>	Este trabajo
<i>Pf</i> Δ4DGCp <i>bdcB</i> (GGAAF)	<i>Pf</i> ΔwspRΔgcbAΔgcbBΔgcbC pMQ72- <i>bdcB</i> (GGAAF)	Este trabajo
<i>Pf</i> Δ4DGCpΔN- <i>bdcB</i>	<i>Pf</i> ΔwspRΔgcbAΔgcbBΔgcbC pMQ72- <i>bdcB</i> (ΔN-terminal)	Este trabajo

Condiciones de conservación. Las cepas de *P. fluorescens* 01 se conservan como una suspensión densa en un medio de cultivo LB en presencia de glicerol 25 % v/v a -80 °C. ²⁵⁵

Condiciones de crecimiento. El stock disponible se empleó para inocular placas de LB sólido que fueron incubadas durante 16 horas a 28°C. Seguidamente, emplearon colonias aisladas para inocular cultivos líquidos de LB. Los cultivos fueron incubados a 28 °C, durante 16 horas con agitación (160 rpm).

Para cultivar las cepas marcadas con resistencia a antibiótico se adicionaron a las placas de LB o a los medios líquidos el antibiótico:

- Gentamicina (Gm) en una concentración: 30 µg/ml

Bordetella bronchiseptica

Cepas: Las cepas de *B. bronchiseptica* empleadas en este trabajo se detallan a continuación.

Cepa	Descripción	Referencia
<i>Bb</i>	<i>B. bronchiseptica</i> CIP 9.73 salvaje (CIP, Colección de cepas del Instituto Pasteur de París, Francia)	320
<i>Bb</i>pvacio	<i>Bb</i> pBBR1-MCS5-pnptII	171
<i>Bb</i>pbdcB	<i>Bb</i> pBBR1-MCS5-pnptIIbdcB	Este trabajo
<i>Bb</i>pbdcB (GGAAF)	<i>Bb</i> pBBR1-MCS5-pnptIIbdcB (GGAAF) HA	Este trabajo
<i>Bb</i> pΔN-bdcB	<i>Bb</i> pBBR1-MCS5-pnptII bdcB(ΔN-terminal) HA	Este trabajo
<i>Bb</i>ΔbdcB	<i>Bb</i> bdcB::Kn	Este trabajo
<i>Bb</i>ΔbdcB:bdcB	<i>Bb</i> bdcB::bdcB	Este trabajo
<i>Bb</i>ΔbdcBpvacio	<i>Bb</i> bdcB::Kn pBBR1-MCS5-pnptII	Este trabajo
<i>Bb</i>ΔbdcBpbdcB	<i>Bb</i> bdcB::Kn pBBR1-MCS5-pnptIIbdcB	Este trabajo
<i>Bb</i>Δ2109	<i>Bb</i> bb2109::Kn	239
<i>Bb</i>ΔpilZ	Deleción limpia <i>pilZ</i> (BB1961)	239
<i>Bb</i>ΔbdcA	<i>Bb</i> bdcA::Kn	239
<i>Bb</i>ΔlapG	Deleción limpia <i>lapG</i>	175
<i>Bb</i>ΔlapA	Deleción limpia <i>lapA</i>	175
<i>Bb</i>pbdcA	<i>Bb</i> pBBR1-MCS5-pnptII bdcA	171

Condiciones de conservación: Los stocks bacterianos se conservaron como una suspensión densa en el medio Stainer-Scholte (SS) a - 80 °C en presencia de glicerol 25 % v/v.

Condiciones de crecimiento: Las cepas de *B. bronchiseptica* se cultivaron a partir del stock en placas de Bordet Gengou Agar (Difco) suplementado con 10% v/v sangre de carnero estéril (BGAS) durante 72 horas a 37 °C. Transcurridas las 72 horas, la biomasa obtenida se empleó para inocular placas de Stainer Scholte suplementadas con sangre de carnero (SS-Sangre, ver anexo 1). Finalmente, estas se incubaron durante 48 horas a 37 °C.

Los cultivos líquidos se realizaron en medio líquido Stainer-Scholte a 37 °C con agitación a 160 rpm.

Para cultivar las cepas marcadas con resistencia a antibiótico se adicionaron los antibióticos correspondientes en las siguientes concentraciones finales:

- Gentamicina (Gm) 50 µg/ml,
- Kanamicina (Km) 80 µg/ml.
- Estreptomycin (Str) 200 µg/ml.

Escherichia coli

Cepas: Para el almacenamiento y la propagación de las construcciones genéticas realizadas se emplearon cepas de *Escherichia coli*.

Cepa	Descripción	Referencia
S17		321
DH5α	$\Delta recA1, \Delta endA1 \Delta lacZ \Delta M15$	322
BTH101	$\Delta cyaA$	323

Condiciones de conservación. Las cepas se conservaron como una suspensión densa en un medio de cultivo LB en presencia de glicerol 25 % v/v a -80°C.

Condiciones de crecimiento. Las cepas fueron inoculadas en placas de LB sólido e incubadas durante 16 horas a 37 °C. Los cultivos líquidos, también en medio LB, fueron inoculados con una colonia aislada e incubados durante 16 horas a 37°C con agitación (160 rpm).

Para cultivar las cepas marcadas con resistencia a antibiótico se adicionaron a las placas de LB o a los medios líquidos los antibióticos correspondientes a las siguientes concentraciones:

Para las cepas S17 y DH5α:

- Kanamicina (Km) 25µg/ml
- Gentamicina (Gm) 10µg/ml

Para la cepa *E.coli* BTH101:

- Kanamicina (Km) 50 µg/ml
- Estreptomycin (Str) 100 µg/ml
- Carbenicilina (Cb) 50µg/ml

Saccharomyces cerevisiae

Cepa: *Saccharomyces cerevisiae* InvSc1, Invitrogen³²⁴. Esta cepa fue empleada tanto para la construcción de plásmidos recombinantes para la obtención de mutantes como para la construcción de plásmidos para expresión.

Condiciones de conservación: se almacenó en medio YPD con glicerol 25 % v/v.

Condiciones de crecimiento: a partir del stock se inocularon placas de YPD sólido, y se incubaron durante 24 horas a 28 °C. La placa crecida se empleó para realizar el crecimiento en medio líquido de YPD. Los cultivos inoculados fueron incubados durante 16 horas a 28°C en agitación (160rpm).

Técnicas empleadas

Amplificación por PCR

La técnica de PCR fue empleada en diversas ocasiones a lo largo del trabajo para amplificar genes ya sea para: realizar clonaciones con enzimas de restricción, realizar clonaciones por recombinación en levaduras y para corroborar la presencia de un fragmento en las construcciones realizadas.

Para las PCRs realizadas para las clonaciones se empleó la enzima PFU de Productos Bio-Lógicos (PB-L) que posee actividad exonucleasa 3'-5' (correctora de errores) y para realizar chequeos de las construcciones realizadas se empleó la enzima Taq PEGASUS también de Productos Bio-Lógicos (PB-L), la misma no presenta actividad correctora de errores.

Para llevar a cabo las amplificaciones por PCR se emplearon las temperaturas y los volúmenes de soluciones recomendadas por el comerciante. Además, dado que *B. bronchiseptica* presenta un alto contenido de G-C en su genoma (68,0 %), se adicionó a la mezcla de reacción 1 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) cada 10 µl de mezcla de reacción para reducir la temperatura de hibridación de los *primers*.

El termociclador empleado fue: El termociclador Biometra TRIO de Damaus. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa empleando marcadores de peso molecular.

Las secuencias de referencia empleadas para el diseño de primer se obtuvieron a partir del genoma de *B. bronchiseptica* RB50 y el diseño de *primers* se realizó empleando el programa SnapGene.

Clonado con enzimas de restricción (digestiones y ligaciones)

Esta estrategia fue empleada para realizar las construcciones para los ensayos de doble híbrido (pKTN25*bdcB* y pUT18*bdcB*) y para trasladar las construcciones obtenidas en pMQ72 mediante la estrategia de clonado en levadura al pBBR1-MCS5-PnptII (*pbdcB*; *pbdcB*(GGAAF); pΔN-*bdcB*).

La clonación con enzimas de restricción consistió en dos etapas. Una etapa de digestión de los vectores y los fragmentos de ADN a clonar, y una segunda etapa de ligación de los fragmentos digeridos al vector digerido.

En la primera etapa, para llevar a cabo las construcciones para doble híbrido, se digirieron los productos de PCR y los vectores con las enzimas XbaI y HindIII. Mientras que, para realizar los clonados en el vector pBBR1-MCS5-PnptII, fue necesario digerir el vector pMQ72 que contenía los fragmentos a clonar, separarlos del plásmido y purificarlos. Con lo cual, las construcciones derivadas del pMQ72 se digirieron con las enzimas EcoRI y HindIII y el fragmento liberado se purificó empleando el kit comercial AccuPrep Gel Purification de Bioneer luego de una corrida electroforética en gel de agarosa.

Todas las enzimas de restricción empleadas fueron adquiridas del proveedor PB-L o Promega. Las mezclas de digestiones se prepararon según lo establecido por el comerciante con el agregado adicional de 1 µl de BSA (1 µg/µl) cada 10 µl de reacción.

Una vez realizadas las digestiones y chequeadas mediante electroforesis en gel de agarosa empleando marcadores de pesos moleculares, se procedió a la segunda etapa de la clonación: la ligación. En esta etapa los fragmentos a clonar fueron ligados al vector empleando la enzima T4 DNA ligasa de Promega. La mezcla de ligación se preparó empleando una relación de fragmento-vector de 3:1 y las concentraciones de buffer y enzima determinadas por el proveedor. La mezcla de ligación se incubó toda la noche a 4 °C. Finalmente, se tomaron 10 µl y se transformaron en cepas S17 o DH5- α electrocompetentes (ver preparación de bacterias electrocompetentes).

Clonado en levaduras

Esta técnica fue empleada para la construcción de plásmidos recombinantes para la obtención de mutantes *B. bronchiseptica* (empleando el plásmido pMQ30) y la expresión de genes (empleando el pMQ72) siguiendo los lineamientos generales descritos por Shanks y colaboradores ³²⁴.

Esta estrategia emplea la maquinaria de reparación del DNA por doble recombinación de la levadura *S. cerevisiae*. Los fragmentos por clonar presentan en sus extremos N- y C- terminales secuencias homólogas a los extremos del vector digerido al que se desean clonar. Tanto los fragmentos a clonar como el vector digerido son introducidos dentro de la levadura mediante un shock térmico y la levadura emplea su propia maquinaria de reparación para unir mediante doble recombinación los extremos del fragmento con los extremos del vector que son homólogos entre sí.

Como **primera etapa de esta estrategia** se requirió la digestión del vector a emplear con la enzima SmaI que deja los extremos romos. Para llevar a cabo la amplificación por PCR del fragmento a clonar fue necesario incluir en el diseño de *primers* secuencias homólogas a los extremos del vector a clonar. Una vez obtenidos los *primers* se realizó la PCR correspondiente.

En **una segunda etapa** de este ensayo se pusieron en contacto los fragmentos amplificados por PCR y el vector con la levadura *S. cerevisiae*. Para ello, en primer lugar, se hirvió durante 10 minutos DNA de esperma de salmón (20 µl por muestra) y se colocaron en hielo. Por otro lado, se tomaron 500 µl de un cultivo *overnight* de *S. cerevisiae* en YPD, se le realizó un spin, se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con buffer TE. Luego del segundo lavado se retiró el sobrenadante y se le agregaron 500 µl de la solución *Lazy bones*, el ADN de esperma de salmón, el vector digerido (200 ng), y los productos de PCR. Como control negativo, el *pellet* de levaduras se resuspendió en las mismas condiciones, pero en ausencia de los productos de PCR. Como control positivo las levaduras fueron resuspendidas con *Lazy bones*, el DNA de esperma de salmón, y el vector sin digerir. Las suspensiones obtenidas se agitaron vigorosamente con vortex durante un minuto y se incubaron 3 días a temperatura ambiente.

Pasados los tres días de incubación, se procedió a **la tercera etapa del ensayo**, la cual consistió introducir mediante un shock térmico los ADNs adentro de la levadura y seleccionar, seguidamente, las levaduras que contengan el plásmido recombinante.

Para ello, las suspensiones de levadura se volvieron a agitar vigorosamente, y se les realizó un shock térmico a 42 °C durante 10-12 minutos. Luego se les realizó un spin y se descartó el sobrenadante. Al *pellet* obtenido se le realizó un lavado con 500 µl de buffer TE. Seguidamente se le realizó un spin y se descartó el sobrenadante. Las levaduras se volvieron a resuspender en 100 µl de buffer TE y se plaquearon en medio Ura-. Estas placas fueron incubadas durante 3 a 5 días hasta aparición de colonias blancas en las placas correspondientes a la clonación y al control positivo.

Por último, se realizó la extracción de los plásmidos recombinantes empleando kits de extracción comerciales realizando algunas modificaciones. A continuación, se describe en detalle.

A las placas con colonias se les agregó 1ml de agua desionizada estéril para resuspenderlas, y la suspensión obtenida se colocó en un tubo de 1,5 ml. Se realizó un spin y se descartó el sobrenadante. El *pellet* obtenido se resuspendió en la solución P1 del kit de extracción y luego se le agregaron 200 µl de perlas de vidrio de 0,5 mm y 250 µl de la solución P2 del kit. Esta última suspensión se agitó vigorosamente empleando vortex durante 2 minutos y luego se incubó a 4 °C durante 5 minutos.

Pasado el tiempo de incubación se le adicionaron 350 µl de buffer P3 previamente enfriado en hielo. Esta suspensión se mezcló varias veces por inversión y se dejó en hielo durante 5 minutos. Terminada esta incubación, se centrifugó durante 10 minutos a 11.000 g y el sobrenadante obtenido se pasó a la columna de filtrado provista en el kit de extracción. A continuación, se siguieron las instrucciones del comerciante para lavar y obtener el plásmido en suspensión. El producto de extracción se empleó para transformar cepas de *E. coli* por electroporación. Las construcciones obtenidas fueron chequeadas por PCR y secuenciación.

Preparación de bacterias electrocompetentes

Las cepas de *E. coli* empleadas para hacer competentes fueron *E. coli* S17, DH5- α y BTH101.

En primer lugar, se realizaron aislamientos a partir de los *stocks* en placas con medio LB sin antibiótico y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, se empleó una colonia para inocular 5 ml de medio líquido de LB, el cual se incubó a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, se emplearon 500 µl del cultivo para inocular un cultivo de 200 ml de LB sin NaCl, el cual fue seguidamente incubado a 37 °C en agitación hasta alcanzar una DO_{650nm}: 0,6-0,8. Alcanzada la DO deseada, se procedió a trabajar en frío. Para ello el Erlenmeyer que contenía el cultivo se colocó en hielo durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo, el medio de cultivo se fraccionó en 4 tubos de 50 ml que se centrifugaron a 5.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Finalizada la centrifugación, se descartó el sobrenadante y se procedió a lavar los *pellets* con glicerol estéril 10% v/v dos veces consecutivas. Luego, los 4 *pellets* se volvieron a

Capítulo 8

resuspender en 25 ml de glicerol 10% v/v y dos de los pellets fueron transferidos uno a cada uno de los otros dos tubos de 50 ml restantes. Los tubos con bacterias se volvieron a centrifugar a 5.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se repitió el proceso, juntando las suspensiones en un solo tubo. Este último se volvió a centrifugar, se le descartó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de glicerol 10% v/v. Finalmente, la suspensión bacteriana fue fraccionada de a 50 µl en tubos de 0,5 ml y se almacenaron a -80 °C hasta ser empleados.

Electrotransformaciones

Para llevar a cabo las electrotransformaciones, los plásmidos a transformar se pusieron en contacto con las bacterias electrocompetentes y seguidamente esta solución fue colocada en una cubeta de electroporación de 0,5 ml. Para realizar la transformación se empleó el equipo Gene Pulser de Biorad empleando las condiciones recomendadas por el fabricante (25 µF, 200Ω, 2,5 kV). Una vez realizada la electroporación se recolectaron las bacterias en 700 µl de LB líquido sin antibiótico empleando un tubo estéril de 1,5ml. Este tubo se incubó durante 1 hora a 37 °C. Finalizado el tiempo de incubación se inocularon placas de LB suplementado con el antibiótico correspondiente para llevar a cabo la selección de las transformantes. Las placas inoculadas fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C. Pasado ese tiempo las colonias obtenidas fueron repicadas para obtener biomasa.

Extracción de ADN plasmídico, Miniprep

Para realizar extracciones de ADN plasmídico se empleó el método de lisis alcalina. En ocasiones utilizando kits comerciales (EasyPure® Plasmid MiniPrep Kit de TransGen Biotech y AccuPrep Plasmid Mini Extraction Kit de Bioneer), y para las miniprep de rutina y *screening* se utilizaron soluciones preparadas por nosotros.

Cuando se realizaron miniprep empleando soluciones preparadas por nosotros se procedió de la siguiente manera:

Se tomó 1ml de la suspensión bacteriana, se centrifugó a 9.000g durante 3 minutos y se le descartó el sobrenadante obtenido. Seguidamente, el *pellet* se resuspendió en 200 µl de la solución P1 y se mezcló vigorosamente empleando vortex. Luego se le agregó 200 µl de la solución P2 y se mezcló suavemente invirtiendo cinco veces el tubo. Una vez mezclado, se le adicionaron 200 µl de la solución P3 y se volvió a mezclar por inversión cinco veces y se centrifugó durante 15 minutos a 13.000 xg. Pasado el tiempo de centrifugación el sobrenadante obtenido se pasó a un tubo de 1,5 ml limpio y se le agregó 15 µl de una solución de sílica para proceder a la extracción del ADN plasmídico. Esa solución se mezcló empleando vortex y se centrifugó durante 10 segundos a 10.000 xg. El sobrenadante obtenido fue descartado y la sílica se lavó dos veces con una solución de lavado. La solución de lavado fue retirada mediante una

centrifugación durante 30 segundos a 10.000 xg y la sílica se dejó secar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Pasado ese tiempo, se agregaron 50 µl de agua desionizada estéril para resuspender la sílica, y el tubo se incubó a 65°C durante 10 minutos para permitir la extracción del ADN plasmídico adsorbido en la sílica. Luego, el tubo se centrifugó durante 5 minutos a 13.000 xg y el sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo limpio. Para controlar que la miniprep haya sido exitosa se realizaron electroforesis en geles de agarosa.

Electroforesis en geles de agarosa

La concentración de agarosa empleada para preparar los geles dependió de la muestra a emplear. Para muestras de DNA plasmídico se empleó un porcentaje de agarosa de 0,8% p/v, para productos de PCR de entre 1000 a 2500 pb un 1 % p/v, mientras que para fragmentos de DNA más pequeños se empleó una concentración de agarosa del 1,5% p/v.

La preparación de los geles consistió en disolver la agarosa en buffer TBE 0,5X empleando microondas, y una vez disuelta la agarosa se adicionó Syber Safe de Invitrogen (1,8 µl cada 30 ml de solución). Toda la preparación fue colocada en una cama para geles horizontales y se esperó a que la agarosa gelificara. Una vez listo el gel, se colocó en la cuba electroforética cubierta con buffer TBE 0,5X y se procedió a realizar la siembra de las muestras. Para ello 5 µl de la muestra fueron resuspendidos en 1µl de buffer de siembra y seguidamente el volumen final se sembró en una de las calles del gel. Finalizada la siembra, se realizó la corrida electroforética aplicando un potencial eléctrico entre 80 y 120 Voltios con una fuente PowerPac (BioRad).

Para visualizar los resultados se empleó una fuente de luz azul incorporada a un transiluminador.

Conjugaciones

Las conjugaciones se emplearon para transferir plásmidos de *E.coli* S17 a *B. bronchiseptica*.

La cepa de *B. bronchiseptica* se creció en una placa de BGAS suplementado con estreptomycinina y se incubó durante 72 horas a 37°C. Al día siguiente de haber inoculado la placa de BGAS con *B. bronchiseptica*, se inoculó una placa de LB con la cepa de *E. coli* con el plásmido a conjugar y se incubó toda la noche a 37 °C. La biomasa de *E. coli* obtenida se empleó para inocular un cultivo líquido, el cual se incubó toda la noche a 37°C en agitación. Al día siguiente se tomó un mililitro del cultivo y se centrifugó durante 3 min a 2.500g. Luego se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió suavemente en 75 µl de LB sin antibiótico. A ese mismo tubo se le agregó la biomasa de *B. bronchiseptica* que había crecido en la placa de BGAS. La suspensión de bacterias obtenidas se colocó en forma de gota aislada en una placa de BGAS o SS-sangre sin antibiótico previamente sembrada con 50 µl de MgCl₂ 2M. Además se agregaron

como controles negativos 50 µl de la suspensión de *E.coli* y 50 µl de la suspensión de *B. bronchiseptica*. La placa inoculada se incubó durante 24 horas a 37 °C.

Transcurrido el tiempo de incubación se levantó la gota de conjugación con una punta de tip y se resuspendió en 900 µl de SS o PBS y se realizaron diluciones seriadas 1/10. Para el caso de la conjugación con los plásmidos pMQ72 y al pBBR1-MCS5 se plaquearon las diluciones: 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} y, para el pMQ30 las diluciones: directa, 10^{-1} y 10^{-2} en placas de BGAS suplementada con estreptomicina y gentamicina. Los controles se plaquearon sin diluir, por separado. Todas las placas fueron incubadas durante 72 horas a 37 °C. Pasado el tiempo de incubación se consideró que la conjugación fue exitosa al observar colonias en las placas de conjugación y ausencia de colonias en las placas de los controles. Las colonias obtenidas se repicaron nuevamente en placas de BGAS Str Gm y finalmente se chequeó por miniprep la incorporación del plásmido.

Método de selección con sacarosa

Este protocolo se empleó para obtener el mutante doble recombinante: *BbΔbdcB:bdcB*.

Antes de comenzar con esta técnica, fue necesario clonar las dos secuencias adyacentes al gen que se quería mutar en el plásmido pMQ30. Estas dos secuencias se corresponden con los sitios donde se espera que ocurra la primera y la segunda recombinación homóloga. En este caso, se clonó el gen *bdcB* entero más las dos secuencias flanqueantes de 200 pb.

Una vez obtenida la construcción requerida se buscó, mediante esta técnica, los mutantes dobles recombinantes. Para esto se aprovechó la presencia del gen *sacB* de *Bacillus subtilis*, en el plásmido pMQ30. Este gen, cuando es introducido en *B. bronchiseptica*, le confiere toxicidad a la bacteria en presencia de sacarosa. Con lo cual, en este ensayo, se introdujo el plásmido pMQ30 en *B. bronchiseptica*, se seleccionaron los simples recombinantes que no crecieron en sacarosa, y a partir de los simples recombinantes, se seleccionaron luego los que perdieron el plásmido, es decir, los dobles recombinantes que crecieron en sacarosa.

A continuación, se detallan los procedimientos realizados.

En primer lugar, para introducir el plásmido en *B. bronchiseptica*, se realizó una conjugación entre la cepa *E. coli* con el plásmido pMQ30 correspondiente y la cepa *B. bronchiseptica* silvestre. Las colonias obtenidas se repicaron en dos placas de diferentes: una BGAS Str Gm y otra placa de LB s/ NaCl con sacarosa 15% p/v. Ambas placas fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C. Pasado el tiempo de incubación se seleccionaron los simples recombinantes: aquellos repiques hemolíticos que hayan crecido en la placa de BGAS y “NO” hayan crecido en la placa de LB Sacarosa 15%. Con los clones seleccionados se preparó un cultivo de 5 ml de DO₆₅₀ 0,05-0,1 y se incubó toda la noche en agitación a 37 °C.

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a la selección de los dobles recombinantes: se realizaron diluciones seriadas 1/10, se plaquearon en LB Sacarosa 15% y LB s/sacarosa y se incubaron durante 48 horas a 37°C. Se consideró que el protocolo funcionó correctamente si aparecieron colonias en las placas de LB sacarosa 15% y un césped bacteriano en la placa LB/ sacarosa. Las colonias que crecieron en la placa de LB sacarosa 15% son dobles recombinantes. Con lo cual se repicaron en BGAS Str y se realizó una evaluación por PCR.

Ensayos de formación de *biofilm* en *P. fluorescens*

Las cepas de *P. fluorescens* a ensayar fueron crecidas en placas de LB suplementadas con gentamicina e incubadas durante 24 horas a 28°C. A partir de estas, se inocularon cultivos de 5 ml de LB suplementados con Gm y se incubaron durante toda la noche a 28 °C. Transcurrido este tiempo, los cultivos fueron empleados para preparar suspensiones bacterianas de DO: 1 en medio K-10T. Por otro lado, se prepararon alícuotas de 900 µl de medio K-10T suplementado con arabinosa 0,2 %v/v que seguidamente fueron inoculadas con 100 µl de la suspensión de *P. fluorescens* DO:1. 100 µl de la suspensión final de DO:0,1 fue agregada en cada fosa de la placa multipocillos por sextuplicado, y la placa inoculada fue incubada durante 6 horas a 28 °C en cámara húmeda. Transcurrido ese tiempo se les retiró las suspensiones bacterianas y se procedió a realizar la técnica de tinción con cristal violeta.

Ensayos de formación de *biofilm* de *B. bronchiseptica* en placas multipocillos

La biomasa obtenida en placas SS- sangre se empleó para preparar suspensiones bacterianas en medio SS con una DO:0,1 conteniendo concentraciones de ácido nicotínico final de 0 mM, 1,0 mM o 4,0 mM. Las suspensiones obtenidas se emplearon para inocular con 100 µl cada una de las fosas de una placa multipocillos por sextuplicado. Las placas inoculadas fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C en una cámara húmeda. Transcurrido ese tiempo se les retiraron las suspensiones bacterianas y se realizó la técnica de tinción con cristal violeta.

Tinción con cristal violeta

Esta técnica se empleó para teñir y cuantificar los *biofilm* formados en placas de multipocillos, reportada previamente¹⁷¹.

Para esto, las suspensiones bacterianas presentes en la placa de multipocillos se descartaron y los pocillos se lavaron con agua desionizada por única vez. Seguidamente, se fijaron los *biofilm* incubando la placa durante 10 minutos a 37 °C. Terminado el tiempo de incubación se agregaron 125 µl de una solución de cristal violeta 0,1%v/v a cada una de las fosas y se volvió a incubar la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, la solución colorante fue retirada y las fosas fueron lavadas

con agua destilada. En esta instancia, los *biofilm* formados se visualizan como una línea en la región de la interfase aire-líquido.

Para poder cuantificar los *biofilm* se adicionaron, 125 µl de ácido acético 33% v/v a cada una de las fosas para disolver el colorante la suspensión se homogeneizó empleando pipeta. Por último, se tomaron 100 µl de la solución obtenida y se cuantificó la absorbancia en un espectrofotómetro a 595nm.

Formación de *biofilm* en tubos de plástico y en vidrio

A partir de las bacterias crecidas en la placa de SS-sangre, se prepararon suspensiones en medio SS líquido con DO final: 0,1 conteniendo concentraciones de ácido nicotínico de 0mM, 1,0 mM o 4,0 mM. Se tomaron 500 µl de cada una y se colocaron por triplicado en tubos de 1,5 ml previamente esterilizados.

En estos cultivos se sumergió además un cubreobjetos cortado manualmente de manera tal que quede sumergido en la suspensión bacteriana. Este sistema se incubó durante 24 horas a 37 °C en una cámara húmeda. Pasado el tiempo de incubación, los vidrios sumergidos fueron colocados en un nuevo vial de 1,5ml conteniendo glutaraldehído 2,5% v/v en PBS. Por otro lado, el medio de cultivo del tubo original fue descartado, y se les adicionó también glutaraldehído 2,5% v/v en PBS. Tanto los vidrios como los viales fueron incubados durante 1 hora a 4 °C. Esta etapa corresponde a la etapa de fijación. Pasado el tiempo de incubación, tanto los vidrios como los viales fueron teñidos con cristal violeta o, en el caso de los vidrios, fueron empleados para la visualización por microscopía de barrido. La tinción con cristal violeta se realizó agregando 500 µl de cristal violeta 0,1%v/v en sobre los tubos de 1,5 ml durante 30 minutos. Seguidamente, la solución colorante fue retirada y los *biofilm* formados fueron lavados con agua desionizada. Finalmente, se tomaron fotografías de los *biofilm* formados a fin de realizar el análisis cualitativo de los mismos.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Esta técnica fue empleada para la visualización de los *biofilm* formados sobre vidrio. Por esto, este protocolo comparte las primeras etapas con del protocolo de formación de *biofilm* en tubos de plástico y en vidrio. La etapa de formación del *biofilm* y de fijación con glutaraldehído 2,5% v/v en PBS son idénticas en ambos protocolos. La única diferencia reside en que, para la observación por SEM, los tubos de 1,5 ml no fueron posteriormente procesados. Las etapas exclusivas de observación por SEM consisten en deshidratación, secado y metalizado de los *biofilm* formados.

Para llevar a cabo la etapa de deshidratación se realizó un tren de deshidratación con alcohol etílico. Para este procedimiento se prepararon soluciones de etanol-PBS 20%, 50%, 70% y 90% v/v. Luego de la fijación con glutaraldehído 2,5% v/v en PBS, los cubreobjetos fueron incubados durante 1 hora en cada solución de manera tal de aumentar gradualmente la concentración de etanol. Por último, las muestras fueron almacenadas en etanol absoluto hasta el momento de ser procesadas.

La etapa de secado fue realizada mediante la técnica de punto crítico y el metalizado fue realizado con oro. Estos procedimientos fueron hechos en el servicio de microscopía electrónica de barrido y microanálisis del LIMF (Facultad de ingeniería-UNLP).

Las observaciones microscópicas fueron realizadas también en el servicio de microscopía electrónica de barrido y microanálisis del LIMF utilizando un microscopio FEI, Quanta 200.

Ensayos de movilidad

Se prepararon placas de SS semisólido (0,35% agar) suplementado con $MgSO_4$ en una concentración final 40 mM y se dejaron secar en la cabina del flujo laminar entre 10-15 minutos. Pasado este tiempo se procedió a la inoculación de estas con las bacterias a ensayar. Para esto se tomó con un escarbadiantes estéril una colonia de la placa donde se realizó el aislamiento y se inoculó seguidamente, en forma vertical, sobre la placa de movilidad. Por cada placa se realizaron 4 inoculaciones. Una vez realizada la inoculación, las placas se taparon, se recubrieron los bordes con *parafilm* para evitar que se sequen y se incubaron durante 18 horas a 37 °C. Durante este tiempo, las células se desplazan de manera individual formando halos concéntricos. Pasadas las 18 horas se midieron los halos empleando una regla.

Doble híbrido en bacteria (BACTH)

Esta estrategia fue empleada para evaluar la capacidad de dimerización de BdcB.

Para este ensayo se emplearon las cepas: *E. coli* pUT18 y pKTN25 sin inserto, *E. coli* pUT18Zip y pKTN25zip y, las cepas *E. coli* pUT18*bdcB* y *E. coli* pKTN25*bdcB* obtenidas de la clonación de *bdcB* en los plásmidos pUT18 y pkn25 por de la técnica de clonación con enzimas de restricción y transformación por electroporación en *E. coli* S17.

Las cepas de *E. coli* conteniendo plásmidos derivados del pKTN25 se inocularon en placas de LB km 50 $\mu\text{g/ml}$ y las cepas conteniendo plásmidos derivados del pUT18 en placas LB Cb 50 $\mu\text{g/ml}$. Seguidamente, se incubaron durante 24 horas a 37°C.

La biomasa obtenida en cada placa se empleó para inocular 5 ml de cultivos líquidos de LB suplementado con Km 50 $\mu\text{g/ml}$ o Cb 50 $\mu\text{g/ml}$, y los mismos se incubaron durante 16 horas a 37°C en agitación. Trascorrido el tiempo de incubación, se procedió a realizar la extracción de los plásmidos mediante miniprep empleando un kit comercial. Una vez obtenidos los plásmidos, los mismos fueron cuantificadas utilizando un equipo NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) y se les realizaron diluciones en agua destilada estéril hasta obtener una concentración final de 25 $\text{ng}/\mu\text{l}$ de los mismos.

Seguidamente, se realizaron co-transformaciones (pUT18 y pKTN25 sin insertos entre sí, pUT18zip y pKTN25zip entre sí y pUT18*bdcB* y pKTN25*bdcB* entre sí) en la cepa *E. coli* BTH 101. Para ello se tomaron 2 μl de cada una de las preparaciones de plásmidos, se pusieron en contacto con la *E. coli*

y se realizó la transformación mediante la técnica de electroporación. Transcurrido el tiempo de incubación, se prepararon diluciones seriadas 1/10, 1/100 y 1/1000 y se plaquearon en medio LB suplementado con 50 µl de IPTG (0,5 mM), 100 µl de X-gal (40 µg/ml), Km (50 µg/ml) y Cb (50 µg/ml). Finalmente, estas placas fueron incubadas durante 20 horas a 28 °C y se visualizaron en las interacciones de acuerdo con el color de las colonias.

Ensayos de sobrevivencia con peróxido de Hidrógeno

Las cepas para emplear en este ensayo fueron inoculadas en placas BGAS e incubadas durante 72 horas a 37 °C. A partir del crecimiento bacteriano, se realizaron suspensiones a fin de obtener 1 ml de la suspensión bacteriana en una concentración aproximada de 3×10^6 bacterias/ml. Esta última suspensión fue empleada seguidamente para inocular tres tubos de 1,5ml que contenían 900 µl de medio de SS suplementado con Gm. Cada uno de estos tubos corresponde a una réplica técnica.

Una vez realizada la inoculación, se homogenizó la suspensión y se procedió a realizar el recuento de UFC al tiempo inicial.

Seguidamente a cada suspensión de bacterias de 3×10^6 bacterias/ml se agregaron 10 µl de H₂O₂ dilución 1/100 del stock 8822,5mM (concentración final: 8,82mM) y se incubó durante 20 minutos a 37 °C en agitación. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a realizar el recuento de UFC finales.

Con el recuento inicial y final de cada una de las bacterias se calculó el porcentaje de bacterias vivas.

Prueba de difusión por discos con peróxido de Hidrógeno

A partir de las bacterias crecidas en placas BGAS, se prepararon suspensiones bacterianas en medio SS líquido con una DO_{650nm} final: 0,1. 100 µl de esta suspensión, se sembraron en placas de SS 0,9 % agar suplementadas con Str Gm y se distribuyó de manera homogénea empleando una espátula de Drygalsky.

Sobre esta misma placa se colocaron dos discos de papel de filtro en el centro de la placa, pero separados entre sí y con una pinza estéril se hizo presión sobre los mismos para que quedaran fijos. Sobre esos discos se agregaron 10 µl de H₂O₂ a una concentración final 50,0 mM. Las placas obtenidas se incubaron durante 24 horas a 37 °C, y luego se midieron los halos de inhibición de desarrollo empleando una regla.

Cinética de crecimiento a pHs ácidos

Las bacterias por analizar se inocularon en placas de BGAS suplementadas con Str-Gm y se incubaron durante 72 horas a 37 °C. Pasado el tiempo de incubación, la biomasa obtenida se empleó para inocular Erlenmeyers conteniendo 20 ml de SS líquidos a diferentes pHs (7,2, 6,0, 5,2 y 5,0). Para el caso del SS pH= 7,2 se empleó el SS original, el cual contiene Tris 12,5 mM como sustancia buffer. En el caso

de los medios de cultivo SS pH= 6,0, 5,2 y 5,0, el SS original fue modificado cambiando el Tris por MES 20 mM como sustancia buffer. Estos Erlenmeyer fueron inoculados con una suspensión bacteriana de manera tal de obtener una DO_{650nm} de 0,250 y se incubaron en agitación durante 9 horas a 37 °C. Durante este tiempo se tomaron alícuotas de 500 μ l cada 1 hora para ir registrando la DO_{650nm} de los cultivos en función del tiempo²⁶⁶.

Resistencia a pH ácido

A partir del crecimiento bacteriano, se realizaron suspensiones bacterianas de $DO_{650nm}:0,1$ (aproximadamente 3×10^8 bacterias/ml) y con esta suspensión se realizaron dos diluciones seriadas 1/10. La primera dilución se realizó en medio de cultivo SS estándar pH= 7,2, mientras que la última dilución 1/10 se realizó en medio SS pH=4,0. Finalmente se obtuvo 1 ml de la suspensión bacteriana en una concentración aproximada de 3×10^6 bacterias/ml. Esta última suspensión fue empleada seguidamente para inocular tres tubos de 1,5 ml que contenían 900 μ l de medio de SS pH= 4,0 suplementado con Gm. Cada uno de estos tubos corresponde a una réplica técnica.

Una vez realizada la inoculación se homogenizó la suspensión y se tomó, rápidamente, una alícuota de 10 μ l y se colocaron en 990 μ l de PBS para realizar el recuento de bacterias iniciales. Seguidamente se procedió a incubar las suspensiones bacterianas durante 4 horas a 37 °C en agitación. Durante el tiempo de incubación, se terminaron de realizar las diluciones seriadas de la alícuota tomada y se plaquearon para realizar el recuento de UFC iniciales.

Transcurrido el tiempo de incubación se realizó el recuento de bacterias finales. Con el recuento inicial y final de cada una de las cepas ensayadas se calculó la fracción de bacterias vivas y el resultado obtenido se normalizó respecto al valor obtenido para la cepa control.

Electroforesis en SDS-PAGE

Tanto para los ensayos de *Western blot* como para la visualización de las muestras de proteínas se realizaron corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida (12,5% acrilamida-bisacrilamida) en condiciones desnaturalizantes de acuerdo con la metodología descrita por Laemmli³²⁵.

Las muestras de proteínas se resuspendieron en buffer Laemmli y se realizaron las corridas electroforéticas en buffer de electroforesis empleando un potencial eléctrico constante entre 100 y 120 Voltios. El equipo usado en estos ensayos fue Miniprotean II de BioRad.

Para la visualización del perfil de proteínas de las muestras, los geles fueron incubados en una solución con el colorante Coomassie Blue R250 durante algunas horas y luego fue decolorado con una solución decolorante.

Western blot

Las proteínas presentes en el gel de electroforesis se transfirieron a la membrana de Polifluoruro de Vinilideno (PVDF) aplicando una diferencia de potencial de 100 V durante una hora en frío empleando el equipo Mini Trans-Blot Cell (BioRad). Posteriormente, se bloqueó la membrana con leche descremada al 5% p/v en TBS (TBS-leche) durante una hora a temperatura ambiente. Seguidamente, se incubó la membrana con el anticuerpo primario (dilución 1/1000 del stock original en TBS-leche) durante toda la noche en agitación a 4°C. Al día siguiente se retiró el anticuerpo primario, se le realizaron 6 lavados a la membrana con TBS-leche, se le adicionó el anticuerpo secundario conjugado a HRP y se dejó en agitación durante dos horas y media a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, la membrana se lavó dos veces con Tween 20 0,1% en TBS y tres veces con TBS. Finalmente, se procedió al revelado. En esta etapa se emplearon dos estrategias diferentes:

Una estrategia consistió en incubar la membrana con el sustrato químico luminiscente comercial Clarity™ Western ECL Substrate (Bio Rad #1705060) y revelar la membrana usando una placa radiográfica.

La otra estrategia consistió en incubar la membrana con 10 ml de una solución que contenía: buffer Tris-Hcl 0,1M pH:8,5, 30 µl de H₂O₂ y una punta de espátula de 3,3-Diaminobenzidina (DAB). En presencia de la enzima HRP y H₂O₂ el DAB se oxida a un compuesto de color marrón que se deposita en la membrana. La membrana con esta solución se incubó durante varios minutos en oscuridad y luego se detuvo la reacción lavando la membrana con agua desionizada.

Anticuerpos primarios empleados:

Anticuerpo Anti-flagelina: Anticuerpo policlonal de ratón específico para la flagelina *B. bronchiseptica* (Tesis Julieta Fernández).

Anticuerpo anti-FHA: anticuerpo policlonal de conejo que reconoce a la adhesina Hemaglutinina Filamentosa.

Anticuerpo anti-bsp22: anticuerpo policlonal de ratón que reconoce a la proteína Bsp22³²⁶.

Anticuerpos secundarios empleados:

Anticuerpo Anti-ratón-HRP: Anticuerpo de cabra que reconoce IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano. Bio-Rad

Anticuerpo Anti-conejo-HRP: Anticuerpo de cabra que reconoce IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano. Bio-Rad

Extracción de ARN

En primer lugar, se inocularon placas de SS-sangre con las cepas a ensayar y se incubaron durante 48 horas a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la biomasa obtenida se empleó para inocular

Capítulo 8

medios de cultivo líquidos SS suplementado con Str Gm a una $DO_{650nm}:0,1$. Seguidamente, estas suspensiones bacterianas fueron incubadas toda la noche a en agitación a $37^{\circ}C$.

Al siguiente día, se procedió a realizar las extracciones de ARN mediante dos etapas diferentes: una primera etapa de resuspensión de las bacterias y lisis, y otra etapa de separación, lavado y obtención de los ARN en medio acuoso.

En la primera etapa de la extracción se tomaron 1,5 ml del cultivo bacteriano y se centrifugaron a 6000 g durante 5 minutos a $4^{\circ}C$. Durante el tiempo de centrifugación se precalentaron 200 μ l del reactivo comercial Max Bacterial Enhancement Reagent (Invitrogen) a $95^{\circ}C$. Luego de la centrifugación, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con los 200 μ l de este reactivo comercial empleando la pipeta. Seguidamente, el tubo se incubó por 4 minutos a $95^{\circ}C$. Pasado este tiempo se le agregó 1ml de Tioisocianato de guanidinio (Trizol®, Invitrogen) y se mezcló nuevamente para lisar las bacterias. Finalmente, la solución se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y se procedió con la segunda etapa de la extracción.

En esta segunda etapa se adicionaron 350 μ l de cloroformo y se mezcló vigorosamente empleando vortex durante 1 minuto. Luego se centrifugó a 11.000 xg durante 15 minutos a $4^{\circ}C$. Después de esta centrifugación se pueden apreciar dos fases diferentes en el tubo: en la parte inferior del tubo una fase orgánica de color rosa, y en la parte superior una fase incolora acuosa que contiene el ARN. La fase incolora se transfirió a un tubo de 2 ml estéril y se le adicionó el mismo volumen de etanol 70% conservado a $-20^{\circ}C$. El tubo fue mezclado por inversión varias veces y el contenido se traspasó a una columna de extracción provista por el kit comercial. Seguidamente, las muestras se trataron siguiendo las instrucciones provistas por el comerciante. Finalizada la extracción, las soluciones de ARN obtenidas fueron cuantificadas empleando el NanoDrop One de Thermo Fisher.

qRT-PCR

Para llevar a cabo estos ensayos se empleó el kit comercial Luna de un solo paso (New England Biolab). Este kit permite hacer la conversión de ARN a ADNc y la subsiguiente amplificación del ADNc empleando una sola mezcla de reacción. Los procedimientos fueron realizados de acuerdo con las instrucciones del comerciante empleando en cada mezcla de reacción 5 μ l de RNA 25ng/ μ l.

Para cada gen analizado se realizaron tres réplicas biológicas y cuatro réplicas técnicas. Como gen de referencia se empleó el gen *recA* dado que se expresa de manera constitutiva en *B. bronchiseptica*. Los niveles de expresión se calcularon empleando el programa Bio-Rad CFX Maestro.

Obtención de macrófagos a partir de médula ósea

Para llevar a cabo la obtención de macrófagos se sacrificaron ratones BALB/c y/o C57BL/6j y se obtuvieron los fémures de estos. Los fémures obtenidos se colocaron en un mortero estéril junto a 5 ml de medio de cultivo RPMI con 10% v/v de suero fetal bovino (SFB) y se presionaron con el mazo a fin de dispersar las células. Se pasó el contenido del mortero por un filtro de células (70 μm) y el líquido se recolectó en un tubo cónico de 50 ml. El contenido del tubo de 50 ml fue trasvasado luego a otro de 15 ml, se centrifugó a 1.000 xg durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante, y al pellet se le agregó 5ml de medio de cultivo, se traspasó a un tubo de 50 ml estéril, se completó con medio hasta un volumen final de 50 ml y la suspensión obtenida fue distribuida en 5 placas de Petri estériles (10 ml en cada una). Las placas inoculadas se incubaron durante 3 días a 37 °C con 5 % CO₂. Pasados esos tres días se les adicionó medio fresco. Al sexto día se descartó el medio y los macrófagos crecidos se removieron de la superficie de la placa empleando un *cell scraper*. Seguidamente se les agregó medio de cultivo nuevo y la suspensión obtenida se empleó para inocular placas multipocillos para trabajar en los experimentos subsiguientes.

Recuento de células

Para el recuento celular, se tomaron 10 μl de la muestra y se mezclaron con 10 μl de azul de tripán. Luego se tomaron 10 μl de esta última muestra y se colocaron en una lámina de vidrio para ser cuantificada por el Contador de células automático EVE™.

Medida de la liberación de la enzima lactato-deshidrogenasa

Para llevar a cabo estos ensayos se obtuvieron macrófagos a partir de médula ósea de ratones BALB/c y C57bl/6j y se cultivaron en placas de 96 pocillos hasta obtener una cantidad de células por pocillo de aproximadamente 1×10^6 células/ml.

Alcanzado este valor de células/ml, se retiró el medio de cultivo y los macrófagos adheridos a la placa se lavaron dos veces con PBS Gibco™, pH 7,2 de Thermo Fisher scientific.

Por otro lado, se prepararon las suspensiones bacterianas a ensayar en medio RPMI suplementado con 10% SFB. Por cada cepa se preparó una suspensión de DO_{650nm}:0,1 para emplear como MOI: 100, una dilución 1/10 de esa suspensión como MOI:10 y una dilución 1/100 como MOI: 1.

Una vez listas las suspensiones, se emplearon para inocular la placa (100 μl de suspensión bacteriana por fosa). Finalizada la inoculación, la placa se centrifugó a 500 g durante 5 minutos para poner en contacto las bacterias con las células y se incubó durante 4 horas a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂.

Transcurrido este tiempo, la placa se volvió a centrifugar, y el medio de cultivo se pasó a una placa de Elisa para realizar la medida de liberación de la enzima lactato deshidrogenasa empleando el kit

Capítulo 8

comercial The CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega). Los procedimientos realizados y las condiciones empleadas fueron acorde a lo establecido por el comerciante.

Se realizaron al menos tres réplicas biológicas con macrófagos obtenidos de ratones BALB/c y tres réplicas biológicas con macrófagos obtenidos de ratones C57BL/6j. Por cada cepa y por cada MOI empleada se realizaron 8 réplicas técnicas.

Medida de muerte celular con Ioduro de Propidio

Para llevar a cabo estos ensayos se obtuvieron macrófagos a partir de ratones BALB/c y C57BL/6j y se cultivaron en placas de 96 pocillos hasta obtener una cantidad de células por pocillo de aproximadamente 1×10^6 células/ml.

Alcanzado este valor de células/ml, se retiró el medio de cultivo y los macrófagos adheridos a la placa fueron lavados dos veces con PBS Gibco™, pH 7,2 (Thermo Fisher Scientific).

Por otro lado, se prepararon las suspensiones bacterianas a ensayar en medio RPMI -IP. Se preparó una suspensión de $DO_{650nm}:0,1$ para emplear como MOI: 100, una dilución 1/10 de esa suspensión como MOI:10 y una dilución 1/100 como MOI: 1.

Una vez listas las suspensiones se emplearon para inocular la placa (100 μ l de suspensión bacteriana por fosa). Como control negativo se inocularon fosas con el medio de cultivo RPMI-IP sin bacterias y como control positivo se empleó medio RPMI-IP suplementado con Triton-X100 en una concentración final 0,01%.

Finalizada la inoculación, la placa se centrifugó durante 5 minutos a 500 g y se colocó en el lector de placas TECAN. Las medidas de fluorescencia se realizaron cada 10 minutos durante 8 horas a 37 °C. (Longitud de excitación: 535nm y Longitud de emisión: 624nm).

Se realizaron al menos tres réplicas biológicas con macrófagos obtenidos de ratones BALB/c y tres réplicas biológicas con macrófagos obtenidos de ratones C57BL/6j. Por cada cepa y por cada MOI empleada se realizaron 8 réplicas técnicas.

Cuantificación de citoquinas y quimioquinas

Esta técnica se empleó para medir los niveles de citoquinas en sobrenadantes de cultivos celulares y para medir citoquinas y quimioquinas en homogeneizados de la cavidad nasal y del pulmón de ratones infectados. Para ello se empleó el kit comercial The LEGENDplex™ (BioLegend), en el cual se pueden seleccionar diferentes paneles en función de las citoquinas o quimioquinas que se quieren analizar.

Para el análisis de citoquinas de los sobrenadantes de cultivos celulares se emplearon dos paneles diferentes: el panel T-helper (Th) que permite la cuantificación simultánea de 12 citoquinas de ratón, incluyendo IL-2, 4, 5, 6, 9, 10, 13, 17A, 17F, 22, IFN- γ y TNF- α y además se empleó el panel de inflamación

que permite la cuantificación simultánea de 13 citocinas de ratón, incluidas IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-23, IL-27, MCP-1, IFN- β , IFN- γ , TNF- α y GM-CSF.

Para el análisis de quimioquinas y citoquinas en la cavidad nasal y en el pulmón de los ratones se emplearon: el panel de Quimioquinas proinflamatorias que permite la cuantificación simultánea de 13 quimiocinas de ratón, incluidas MCP-1 (CCL2), RANTES (CCL5), IP-10 (CXCL10), Eotaxina (CCL11), TARC (CCL17), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), MIG (CXCL9), MIP-3 α (CCL20), LIX (CXCL5), KC (CXCL1), BLC (CXCL13) y MDC (CCL22), y para el análisis de las citoquinas se empleó el panel de inflamación que incluye las siguientes citoquinas: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-23, IL-27, MCP-1, IFN- β , IFN- γ , TNF- α y GM-CSF.

Las muestras de la cavidad nasal y de los pulmones constaron del sobrenadante de los homogenizados de nariz y pulmón obtenido tras una centrifugación a 10000 xg a 4°C durante 10 minutos.

Para proceder a la cuantificación de citoquinas y quimioquinas se siguieron las instrucciones del comerciante y se cuantificaron por citometría de flujo.

Ensayos de fagocitosis en macrófagos obtenidos de ratones BALB/c y en macrófagos Raw 264.7

Los macrófagos fueron cultivados en medio de cultivo para macrófagos hasta un 90% de confluencia en placas de 96 pocillos a 37 °C y 5% CO₂. Seguidamente se realizaron dos lavados en PBS Gibco™, pH 7,2 y se añadieron las suspensiones bacterianas a los pocillos a una MOI de 100. Las placas se centrifugaron a 5000 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente y se incubaron a 37 °C. Después de 1 hora, se administraron 100 μ l de solución de tritón X al 0,1% (Sigma) en PBS a un subconjunto de pocillos, seguido de una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente y pipeteo vigoroso para lisar las células. Se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en placas en BGA para cuantificar las bacterias totales (intracelulares y extracelulares) presentes después de 1 hora. A la hora, se retiró el sobrenadante de los pocillos restantes y se reemplazó con 100 μ l de solución de gentamicina 100 μ g/ml (Sigma-Aldrich) en DMEM a los pocillos de muestra restantes. Las placas se incubaron en 5% de CO₂ a 37 °C, y luego a las 1, 4 y 24 horas después de la adición de gentamicina, los pocillos apropiados se lavaron 3 veces con DMEM y se trataron con 100 μ l de tritón X al 0,1% para lisar los macrófagos. Finalmente, a fin de realizar el recuento bacteriano, se realizaron diluciones seriadas de los pocillos tratados con tritón-X y se inocularon placas BGAS.

Modelo murino de infección

En los ensayos de infección en ratones se emplearon dos tipos de cepas: BALB/c y C57BL/6j de entre 4 y 5 semanas de edad. Ambas especies de ratones se emplearon en dos esquemas de infección diferentes: un esquema de infección con dosis altas y un esquema de infección con dosis bajas.

Para ambos esquemas de infección se prepararon suspensiones de bacterias en PBS a partir de bacterias cultivadas en placas SS-Sangre suplementadas con Str durante 48 horas. Para los ensayos de infección con dosis altas se preparó una suspensión de 1×10^6 UFC/ml mientras que para los ensayos con dosis bajas se empleó una suspensión de 1×10^4 UFC/ml.

El esquema de infección con dosis altas consistió en infectar a los ratones con 30 μ l de la suspensión bacteriana. En los ensayos con ratones BALB/c se sacrificaron 5 ratones por cepa en una cámara con CO₂, a los días 7, 14, 28 y 56 post- infección. En los ensayos con ratones C57BL/6j se sacrificaron 4 ratones por cepa a los días 7 y 14 post- infección. Luego del sacrificio, se recolectaron las muestras de la cavidad nasal, la tráquea y los pulmones.

El esquema de infección con dosis bajas consistió en infectar a los ratones con 5 μ l de la suspensión bacteriana. En los ensayos con ratones C57BL/6j se sacrificaron 3 ratones por cepa a los días 3, 7, 14, 28 y 56 post- infección. En los ensayos con ratones BALB/c se sacrificaron 4 ratones por cepa a los días 3, 7 y 14.

Todas las muestras de cavidad nasal, tráquea y pulmón fueron recolectadas en tubos conteniendo 1 ml de PBS y perlas de 1,3 mm y 0,4 mm. Se homogeneizaron empleando un homogeneizador Bead Mill (VWR) y se realizaron diluciones seriadas para realizar el recuento bacteriano. Las diluciones fueron plaqueadas en placas de BGAS suplementadas con Str e incubadas durante 48 horas a 37 °C. Trascorrido ese tiempo se realizó el recuento de UFC y se determinó el número de bacterias por órgano.

Herramientas bioinformáticas

Para llevar a cabo el análisis *in silico* de *bdcB* se emplearon una serie de servidores y programas que se listan a continuación.

El servidor NCBI de las siglas en inglés: National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para la información biotecnológica). Esta base de datos almacena y actualiza constantemente información del campo de la biotecnología. Además, ofrece herramientas como BLASTN y BLASTP para el análisis de secuencias de DNA y de proteínas respectivamente. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

El sitio web Uniprot (Universal Protein). Este sitio almacena información sobre proteínas²⁴². También disponible *on line* (<https://www.uniprot.org/>)

El predictor de estructuras Alpha fold2. Este programa se empleó para predecir la estructura proteica de BdcB. Este programa fue desarrollado por DeepMind de Alphabets/Google. Este predictor

Capítulo 8

presenta predicciones mucho más exactas que cualquier otro programa de predicción. Disponible de manera *online*^{247,327}(<https://colab.research.google.com/github/deepmind/alphafold/blob/main/notebooks/AlphaFold.ipynb>).

Programa UCFS Chimera. Este programa se empleó para visualizar los modelos de proteínas predichos por Alphafold2²⁴⁶.

ClustalW. Este programa permite realizar alineamientos múltiples de secuencias. En este trabajo se empleó para realizar alineamientos de las secuencias de los dominios GGDEF de diguanilato ciclasas activas²⁴⁴. Este programa está disponible de manera *on line*: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

Weblogo: Permite realizar representaciones gráficas de los alineamientos obtenidos²⁴⁵. Está disponible *on line*: <https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>

Análisis Estadístico

Los gráficos y análisis estadísticos se realizaron empleando el programa GraphPad Prism 6. Las comparaciones entre dos grupos se analizaron con *unpaired Student's t-test* mientras que las comparaciones entre más grupos se analizaron con *one-way ANOVA* seguido de un *test* de Tukey para múltiples comparaciones.

Anexo 1: Medios de Cultivo

Medios de cultivo para el crecimiento de *B. bronchiseptica*

Medio Bordet-Gengou agar sangre (BGAS)

Agar Bordet Gengou DIFCO: 30 g/l

Glicerol: 1 % p/v

Sangre: 10 % v/v

Medio Stainer Scholte (SS)

Glutamato de sodio monohidratado: 570 mM

L-prolina: 20 mM

NaCl: 430 mM

KH₂PO₄ 36 mM

KCl: 20 mM

MgCl₂.6H₂O: 5 mM

CaCl₂.2H₂O: 1,4 mM

Tris-HCl: 120 mM

Complemento 100X

pH 7,20

Agar: 15 g/l para medios sólidos; 3,5 g/l para medios de movilidad; sin agregado de agar para medios líquidos

Sangre 10 %v/v. Solo para medios sólidos SS-sangre.

Complemento 1000X

L-cisteína: 4,0 % p/v

FeSO₄.7H₂O: 1,0 % p/v

Ácido ascórbico: 2,0 % p/v

Ácido nicotínico 0,4 % p/v

HCl concentrado: 10,0 % v/v

Complemento 100X

Complemento 1000X: 1ml

Agua desionizada: 9 ml

L-glutation reducido: 0,1 g

Medios de cultivo para el crecimiento de *E. coli*

Composición del medio de cultivo Luria-Bertani (LB)

Triptona: 10 g/l

Extracto de levadura: 5 g/l

NaCl: 5 g/l

Agar: 15 g/l para medio sólido. Sin agregado de agar para medio líquido

Medio de cultivo para ensayos de *biofilm* con *P. fluorescens*

Composición del medio de cultivo K-10T

Triptona: 0,2 % p/v

Glicerol: 0,2 % v/v

MgSO₄: 0,06 M

Tris-HCl: 0,05 M

K₂HPO₄: 0,001 M

pH: 7,4

Medios de cultivos para *S. cerevisiae*

Medio YPD

Peptona: 20 g/l

Extracto de levadura: 10 g/l

Glucosa: 20 g/l

Agar: 15 g/l para medio sólido. Sin agregado de agar para medio líquido

Medio URA-

Yeast Nitrogen base (YNB): 6,7 g/l

Complete Supplement Mixture (CSM): 0,76 g/l

Glucosa: 15 g/l

Agar: 15 g/l

Medios de cultivos para ensayos con células

Medio de cultivo para macrófagos

DMEM: 700 ml

Medio de acondicionamiento LCM: 200 ml

SFB (Suero fetal bobino): 100 ml

Medio de cultivo para ensayos con Ioduro de propidio (RPMI-IP)

RPMI: 18 ml

SFB: 2 ml

HEPES 1M: 500 μ l

IP 1mg/ml: 200 μ l

Anexo 2: Soluciones empleadas

PBS

KH_2PO_4 : 0,428 g/l

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 3,5 g/l

NaCl: 7,2 g/l

Agua desionizada: hasta completar volumen

Soluciones para Miniprep

P1

Tris-HCl: 50 mM

EDTA: 10 mM

pH: 8,0

P2A

NaOH: 8 g/l

P2B

SDS: 20 g/l

P3

Capítulo 8

Acetato de potasio: 1,5 M

pH: 5,5

Suspensión de sílica

Sílica: 2g

Agua desionizada: 15,0 ml

Solución de lavado de sílica 10 X

NaCl: 500 mM

Tris- HCl: 100 mM

EDTA: 25 mM

pH: 7,5

Solución de lavado sílica 1X

Solución de lavado 10X: 10% v/v

Etanol: 50 % v/v

Soluciones para electroforesis en gel de agarosa:

Buffer TBE (10X)

Ácido Bórico: 1M

Tris-HCl: 1,0 M

EDTA: 0,02 M

Buffer de siembra

Sacarosa: 40% p/v

Azul de Bromofenol 0,25% p/v

Soluciones para clonados en levadura:

Solución Lazy Bones

Polietilen glicol (PM 1350): 40% p/v

Acetato de litio: 0,1 M

EDTA: 1M

Tris-HCl: 10 mM

pH: 7,5

Capítulo 8

Buffer TE

EDTA: 1mM

Tris-HCl: 10mM

PH: 8,0

Soluciones para electroforesis en SDS PAGE

Buffer de electroforesis

Tris-HCl: 50 mM

Glicina: 370 mM

SDS 10: % p/v

pH: 8,3

Buffer Laemmli 6X

Tris HCl: 0,05 M

SDS: 2% p/v

Glicerol: 1% v/v

EDTA: 0,02 M

Azul bromofenol: 0,08% p/v

β -mercaptoetanol: 5% v/v

pH: 6,8

Coomasie Blue R250

Coomasie Blue R250: 0,2 % p/v

Metanol: 40 % v/v

Ácido acético: 20 % v/v

Decolorante para Coomasie Blue

Metanol: 40 % v/v

Ácido acético: 10 % v/v

Soluciones para Western blot

Buffer de transferencia

Tris-HCl: 0,025 M

Capítulo 8

Glicina: 1 M

Metanol: 20 % v/v

TBS 10X

Tris-HCl: 1M

NaCl: 1,5 mM

Anexo 3: Plásmidos empleados

Los plásmidos y construcciones utilizadas en este trabajo se detallan a continuación.

Nombre del plásmido	Descripción	Referencia
pMQ72	Vector de expresión en <i>Pf</i> . Presenta el gen de resistencia a Gm	324
pMQ72<i>bdcB</i>	Vector pMQ72 con el gen de <i>bdcB</i> fusionado a HA	Este trabajo
pMQ72<i>gcbC</i>	Vector pMQ72 con el gen <i>gcbC</i> de la diguanilato ciclasa de <i>Pf</i>	248
pMQ72<i>bdcB</i> (GGAAF)	Vector pMQ72 con el gen <i>bdcB</i> con el sitio GGDEF modificado por GGAAF y fusionado a HA	Este trabajo
pMQ72ΔN-<i>bdcB</i>	Vector pMQ72 con el gen de <i>bdcB</i> sin los primeros 165 nucleótidos y fusionado a HA	Este trabajo
<i>pvacío</i>	Vector pBBR1-MCS5 con promotor pnptII. Presenta el gen de resistencia a Gm	171
<i>pbdcB</i>	Vector pBBR1-MCS5 con promotor pnptII y el gen de <i>bdcB</i> fusionado a HA	Este trabajo
<i>pbdcA</i>	Vector pBBR1-MCS5 con promotor pnptII y el gen de la diguanilato ciclasa <i>bdcA</i> de <i>Bb</i>	328
<i>pbdcB</i> (GGAAF)	Vector pBBR1-MCS5 con promotor pnptII y el gen de <i>bdcB</i> con el sitio GGDEF modificado por GGAAF y fusionado a HA	Este trabajo
pΔN-<i>bdcB</i>	Vector pBBR1-MCS5 con promotor pnptII y el gen de <i>bdcB</i> sin los primeros 165 nucleótidos y fusionado a HA	Este trabajo
pKTN25	Vector de expresión para ensayos de doble híbrido. Presenta el gen de resistencia a Kn.	329
pUT18	Vector de expresión para ensayos de doble híbrido. Presenta el gen de resistencia a Cb.	329
pKTN25<i>bdcB</i>	Vector pKTN25 con el gen de <i>bdcB</i>	Este trabajo

pUT18<i>bdcB</i>	Vector pUT18 con el gen de <i>bdcB</i>	Este trabajo
pKTN25zip	Control positivo para ensayo de doble Híbrido	329
pUT18zip	Control positivo para ensayo de doble Híbrido	329
pMQ30	Vector de reemplazo alélico, no replicativo en <i>B. bronchiseptica</i> . Presenta un gen resistencia a Gm	324
pMQ30mut<i>bdcB</i>	Vector empleado para realizar el mutante <i>BbΔbdcB</i>	Este trabajo
pMQ30revertante<i>bdcB</i>	Vector empleado para complementar el mutante <i>BbΔbdcB</i>	Este trabajo

Anexo 4: *Primers* utilizados

Los *primers* empleados en este trabajo se detallan a continuación.

Nombre	Uso	Secuencia (5'-3')	Referencia
F1BB3903Fb	Construcción <i>BbΔbdcB</i> y <i>BbΔbdcB:bdcB</i>	ctgtttatcagaccgcttctgcgttctgataa tcccatcgctct	Este trabajo
F1BB3903R	Construcción <i>BbΔbdcB</i>	TCTAGAAAGTATAGGAACT TCGAAGCAGCTCCAGCCTA GCGTTGTCCAGCCTCG	Este trabajo
F2BB3903F	Construcción <i>BbΔbdcB</i>	AGGTCGACGGATCCCCGG AATTAATTCTCATGTTTCA TAACGGCCCCGCGG	Este trabajo
F2BB3903Rb	Construcción <i>BbΔbdcB</i> y <i>BbΔbdcB:bdcB</i>	caatttcacacaggaacagctatGTG GCAGTATGCGCGC	Este trabajo
Pmq3903 F1	Construcciones: pMQ72 <i>bdcB</i> y pMQ72 <i>bdcB</i> (GGAAF)	GCGAATTCGAGCTCGGTAC CCGGAGGGATTGCGATGG CGAGGctg	Este trabajo
ggaaf3903 R1	Construcción pMQ72 <i>bdcB</i> (GGAAF)	GACAGCACCGCGGCGAAC GCCGCGCCGCCACCC	Este trabajo
ggaaf3903 F2	Construcción pMQ72 <i>bdcB</i> (GGAAF)	GGGCGGCgcgcgTTCGCCG CGGTGCTGTCTG	Este trabajo
DeltaN55BB3903F	Construcción pMQ72ΔN- <i>bdcB</i>	GCGAATTCGAGCTCGGTAC CCGGGATTatggCGCCGC GACGCTGCAGG	Este trabajo
reverse3903HA	pMQ72 <i>bdcB</i> , pMQ72 <i>bdcB</i> (GGAAF) y pMQ72ΔN- <i>bdcB</i>	GAACATCGTATGGGTATGC GCCAGCCGTGCGGCTGG	Este trabajo

Capítulo 8

fw HA p/3903	Fusión transcripcional HA para pMQ72 <i>bdcB</i> , pMQ72 <i>bdcB</i> (GGAAF) y pMQ72Δ <i>N-bdcB</i>	CACGGCTGGCGCATACCCA TACGATGTTCTGACTATG C	Este trabajo
R HA p/3903	Fusión transcripcional HA para pMQ72 <i>bdcB</i> , pMQ72 <i>bdcB</i> (GGAAF) y pMQ72Δ <i>N-bdcB</i>	aggtcgactctagaggatccccTTAAG CGTAATCTGGAACGTCATA	Este trabajo
BB3093_B2H_ FW	Construcciones PUT18 <i>bdcB</i> y pKTN25 <i>bdcB</i>	cgcgcgccaagcttgATGGCGAGG CTGGACAACG	Este trabajo
BB3093_B2H_ RV	Construcciones PUT18 <i>bdcB</i> y pKTN25 <i>bdcB</i>	gcgcgcgctctagagtTGCGCCAG CCGTGCGGC	Este trabajo
cyaA F	qRT-PCR de <i>cyaA</i>	CACTGAGCAGAACAATCCT TTCC	330
cyaA R	qRT-PCR de <i>cyaA</i>	CGTGAGCATCTGGCTTTCA C	330
Prt F	qRT-PCR de <i>prt</i>	CAGCACGGCATCCACATC	330
Prt R	qRT-PCR de <i>prt</i>	GCCTGACGACCGCTTACC	330
FhaC F	qRT-PCR de <i>fhaC</i>	GGAATCAGTGCCGACTTCG A	330
FhaC R	qRT-PCR de <i>fhaC</i>	AGTTCCCACCCAGATATTG GGTAT	330
fimD F	qRT-PCR de <i>fimD</i>	GTATCCCCAGAAAGGCGA AGT	330
fimD R	qRT-PCR de <i>fimD</i>	GCGAACCTCCGCGTTGT	330
Dnt F	qRT-PCR de <i>dnT</i>	GCAGAAAGTACGGCACTA CAAGGT	330
Dnt R	qRT-PCR de <i>dnT</i>	CCTGTTGTGATTTTCGATT CCA	330
BopN F	qRT-PCR de <i>bopN</i>	TGCCGAGGAAAAGCATCA CT	330
BopN R	qRT-PCR de <i>bopN</i>	GCCAGAGCATCGGACGTT	330
Bsp22 F	qRT-PCR de <i>bsp22</i>	CGGCACGGGCGTCAT	330
Bsp22 R	qRT-PCR de <i>bsp22</i>	GGTGTAGGCACTTTCGAGT TCCT	330

Capítulo 8

BopD F	qRT-PCR de <i>bopD</i>	CGGCTCGGTGAAGACATCT AC	330
BopD R	qRT-PCR de <i>bopD</i>	GCCTCCCGCATCTGTTGA	330
BopB F	qRT-PCR de <i>bopB</i>	GCTCAATTCGACGAGGCCT AT	330
BopB R	qRT-PCR de <i>bopB</i>	TGTGCGTACTCGCCATATC G	330
BteA F	qRT-PCR de <i>bteA</i>	CGTGAAATGGCTGGATGG	330
Btea R	qRT-PCR de <i>bteA</i>	GCGTCGGTGGATTGCTG	330
RecA F	qRT-PCR de <i>recA</i>	gagcacaaggaatggccatc	330
RecA R	qRT-PCR de <i>recA</i>	gctgactatgcctggttct	330
BtrS F	qRT-PCR de <i>btrS</i>	CACTGCTTTCGGTTCCTGT	108
BtrS R	qRT-PCR de <i>btrS</i>	ACGCTGTTCGTAGCCTCGTT	108
BtrA F	qRT-PCR de <i>btrA</i>	CCGCTTACCTGCTTTGGA G	108
BtrA R	qRT-PCR de <i>btrA</i>	GATGCGATGACCTGGA G	108
BtrV F	qRT-PCR de <i>btrV</i>	GCGGCTTGACTACATTTCC A	108
BtrV R	qRT-PCR de <i>btrV</i>	TTCGCACAGCACCAGTT	108
BtrU F	qRT-PCR de <i>btrU</i>	TACGAGGAAAGCCGCAAC	108
BtrU R	qRT-PCR de <i>btrU</i>	GAGATGGCGAGAACCCAC TT	108

Capítulo 9: Bibliografía

Bibliografía

1. R A Goodnow. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. . *Microbiol Rev* **44**, 722–738 (1980).
2. Bordet J & Gengou O. Le microbe de la coqueluche. *Ann Inst Pasteur (Paris)*. **20**, 48–68 (1906).
3. Diavatopoulos, D. A. *et al.* *Bordetella pertussis*, the Causative Agent of Whooping Cough, Evolved from a Distinct, Human-Associated Lineage of *B. bronchiseptica*. (2005) doi:10.1371/journal.ppat.0010045.
4. Mattoo, S. & Cherry, J. D. Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella pertussis* and Other *Bordetella* Subspecies. *Clin Microbiol Rev* **18**, 326–382 (2005).
5. de Greeff, S. C. *et al.* Pertussis Disease Burden in the Household: How to Protect Young Infants. *Clinical Infectious diseases* **50**, 1339–1345 (2010).
6. American Academy of Pediatrics. Summaries of Infectious Diseases. *Report of the Committee on Infectious Diseases*. (2012).
7. Centers for Disease Control and Prevention. Pertussis. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*. (2012).
8. Paddock, C. D. *et al.* Pathology and Pathogenesis of Fatal *Bordetella pertussis* Infection in Infants. *Clinical infectious diseases* **47**, 328–338 (2008).
9. Quinn, H. E. & McIntyre, P. B. lessons from Australia. *Bull World Health Organ* **89**, 666–674 (2011).
10. Kristine M Bisgard *et al.* Infant pertussis: who was the source? *Pediatr Infect Dis J*. **23**, 985–989 (2004).
11. James D. Cherry & Patrick Olin. The Science and Fiction of Pertussis Vaccines . *Pediatrics* **104**, 1381–1383 (1999).
12. J D Nelson. The changing epidemiology of pertussis in young infants. The role of adults as reservoirs of infection. *Am J Dis Child* . **132**, 371–373 (1978).
13. Aaron M Wendelboe *et al.* Transmission of *Bordetella pertussis* to young infants. *Wolters Kluwer* **26**, 293–299 (2007).
14. Karene Hoi Ting Yeung, Philippe Duclos, E Anthony S Nelson, Raymond Christiaan & W Hutubessy. An update of the global burden of pertussis in children younger than 5 years: a modelling study. *Lancet Infect Dis* . **17**, 974–980 (2017).
15. John F. Porter, Kathleen Connor & Willie Donachie. Isolation and characterization of *Bordetella parapertussis*-like bacteria from ovine lungs. *Microbiology society* **140**, 255–261 (1994).
16. van der Zee, A., Mooi, F., van Embden, J. & Musser, J. *Molecular Evolution and Host Adaptation of Bordetella spp.: Phylogenetic Analysis Using Multilocus Enzyme Electrophoresis and Typing with Three Insertion Sequences*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* vol. 179 <https://journals.asm.org/journal/jb> (1997).
17. de Jong, M. F., Akkermans, J. P. W. M., de Jong, M. F. & Akkermans, J. P. W. M. Investigation into the pathogenesis of atrophic rhinitis in pigs. I. Atrophic rhinitis caused by *Bordetella*

- bronchiseptica and Pasteurella multocida and the meaning of a thermolabile toxin of P. multocida. *Veterinary Quarterly* (2011) doi:10.1080/01652176.1986.9694044.
18. M Brassinne, A Dewaele & M Gouffaux. Intranasal infection with Bordetella bronchiseptica in gnotobiotic piglets. *Res Vet Sci* . **20**, 162–166 (1976).
 19. Zhanqin Zhao *et al.* The occurrence of Bordetella bronchiseptica in pigs with clinical respiratory disease. *Vet J* . **188**, 337–340 (2011).
 20. B.S. SchulzS. KurzK. WeberH.-J. BalzerK. Hartmann. Detection of respiratory viruses and Bordetella bronchiseptica in dogs with acute respiratory tract infections. *The veterinary Journal* **201** 365–369 (2014).
 21. A J Coutts *et al.* Studies on natural transmission of Bordetella bronchiseptica in cats. *Vet. Microbiol.* **48**, 19–27 (1996).
 22. Mattoo, S., Miller, J. F. & Cotter, P. A. *Role of Bordetella bronchiseptica Fimbriae in Tracheal Colonization and Development of a Humoral Immune Response. INFECTION AND IMMUNITY* vol. 68 <http://www.sanger.ac.uk> (2000).
 23. Woolfreyt, B. F. & Moody, J. A. *Human Infections Associated with Bordetella bronchiseptica. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS* vol. 4 <https://journals.asm.org/journal/cmvr> (1991).
 24. Huebner, E. S., Christman, B., Dummer, S., Tang, Y. W. & Goodman, S. Hospital-acquired Bordetella bronchiseptica infection following hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Microbiol* **44**, 2581–2583 (2006).
 25. A J Coutts *et al.* Studies on natural transmission of Bordetella bronchiseptica in cats. *Vet Microbiol* . **48**, 19–27 (1996).
 26. D A Bemis, L E Carmichael & M J Appel. Naturally occurring respiratory disease in a kennel caused by Bordetella bronchiseptica. *Cornell Vet* . **67**, 282–293 (1977).
 27. Schulz, B. S., Kurz, S., Weber, K., Balzer, H. J. & Hartmann, K. Detection of respiratory viruses and Bordetella bronchiseptica in dogs with acute respiratory tract infections. *Veterinary Journal* **201**, 365–369 (2014).
 28. Weyant, R. S. *et al.* *Bordetella holmesii sp. nov., a New Gram-Negative Species Associated with Septicemia. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* vol. 33 <https://journals.asm.org/journal/jcm> (1995).
 29. Vandamme, P. *et al.* *Bordetella trematum sp. nov., Isolated from Wounds and Ear Infections in Humans, and Reassessment of Alcaligenes denitrificans Ruger and Tan 1983. INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY* vol. 46 (1996).
 30. von Wintzingerode, F. *et al.* (No Title). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* vol. 51 (2001).
 31. Soo Ko, K. *et al.* New Species of Bordetella, Bordetella ansorpii sp. nov., Isolated from the Purulent Exudate of an Epidermal Cyst. *J Clin Microbiol* **43**, 2516–2519 (2005).
 32. Vandamme, P. A. *et al.* (No Title). doi:10.1099/ijsem.0.000473.

33. K. Kersters *et al.* *Bordetella avium* sp. nov., Isolated from the Respiratory Tracts of Turkeys and Other Birds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **34**, (1984).
34. Cookson, B. T. *et al.* *Bacteremia Caused by a Novel Bordetella Species, 'B. hinzii'*. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* <https://journals.asm.org/journal/jcm> (1994).
35. Yury V. Ivanov *et al.* Identification and taxonomic characterization of *Bordetella pseudohinzii* sp. nov. isolated from laboratory-raised mice. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**, 5452–5459 (2016).
36. Soldati, T. *et al.* Evolution of *Bordetellae* from Environmental Microbes to Human Respiratory Pathogens: Amoebae as a Missing Link. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* | www.frontiersin.org **7**, 510 (2017).
37. Tran, T. D., Aman Ali, M., Lee, D., Félix, M.-A. & Luallen, R. J. Bacterial filamentation as a mechanism for cell-to-cell spread within an animal host. *Comunicaciones de la naturaleza* (2022) doi:10.1038/s41467-022-28297-6.
38. Karen B Register & Robert A Kunkle. Strain-specific virulence of *Bordetella hinzii* in poultry. *Avian Dis* . **53**, 50–54 (2009).
39. Gerlach, G., von Wintzingerode, F., Middendorf, B. & Gross, R. Evolutionary trends in the genus *Bordetella*. *Microbes Infect* **3**, 61–72 (2001).
40. Julian Parkhill, Mohammed Sebahia, Andrew Preston, Lee D Murphy & Nicholas Thomson. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nature Genetic* **35**, 32–40 (2003).
41. Marchitto, K. S., Smith, S. G., Locht, C. & Keith, J. M. Nucleotide Sequence Homology to Pertussis Toxin Gene in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*. *Infect Immun* **55**, 497–501 (1987).
42. Theresa M. Finn, L. A. S. Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. *Mol Microbiol* **16**, 625–634 (1995).
43. Melvin, J. A., Scheller, E. v, Miller, J. F. & Cotter, P. A. *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. (2014) doi:10.1038/nrmicro3235.
44. Huam Yuk, M., Harvill, E. T. & Miller, J. F. *The BvgAS virulence control system regulates type III secretion in Bordetella bronchiseptica*. (1998).
45. Seema, Mattoo., Jeff F., Miller. & Peggy A. Cotter. Role of *Bordetella bronchiseptica* Fimbriae in Tracheal Colonization and Development of a Humoral Immune Response. *Infect Immun*. **68**, 2024–2033 (2000).
46. Eric T, Harvill. *et al.* Multiple Roles for *Bordetella* Lipopolysaccharide Molecules during Respiratory Tract Infection. *Infect Immun*. **68**, 6720–6728 (2000).
47. Eric T. Harvill, Peggy A. Cotter, Ming Huam Yuk & Jeff F. Miller. Probing the Function of *Bordetella bronchiseptica* Adenylate Cyclase Toxin by Manipulating Host Immunity. *Infect Immun* **67**, 1493–1500 (1999).

48. Cotter, P. A. & Miller, J. F. BvgAS-Mediated Signal Transduction: Analysis of Phase-Locked Regulatory Mutants of *Bordetella bronchiseptica* in a Rabbit Model. *Infect Immun* 3381–3390 (1994).
49. Mochizuki, M., Yachi, A., Ohshima, T., Ohuchi, A. & Ishida, T. *Etiologic Study of Upper Respiratory Infections of Household Dogs*. *J. Vet. Med. Sci* vol. 70 (2008).
50. Herman Egberink *et al.* *Bordetella bronchiseptica* infection in cats. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg* . **11**, 610–614 (2009).
51. G Martínez de Tejada, J F Miller & P A Cotter. Comparative analysis of the virulence control systems of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Mol Microbiol* . **22**, 895–908 (1996).
52. Carol S Inatsuka *et al.* Pertactin is required for *Bordetella* species to resist neutrophil-mediated clearance. *Infect Immun* . **78**, 2901–2909 (2010).
53. Julio, S. M. *et al.* 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. (2009) doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06623.x.
54. Johnson, R. M., Nash, Z. M., Dedloff, M. R., Shook, J. C. & Cotter, P. A. DegP Initiates Regulated Processing of Filamentous Hemagglutinin in *Bordetella bronchiseptica*. (2021) doi:10.1128/mBio.01465-21.
55. Mazar, J. & Cotter, P. A. Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion. (2006) doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05392.x.
56. Coutte, L. *et al.* Role of Adhesin Release for Mucosal Colonization by a Bacterial Pathogen. *The Journal of Experimental Medicine J. Exp. Med.* □ *The* **197**, 735–742 (2003).
57. K. Saukkonen, C. Cabellos, M. Burroughs, S. Prasad & E. Tuomanen. Integrin-mediated localization of *Bordetella pertussis* within macrophages: role in pulmonary colonization. *J Exp Med*. **173**, 1143–1149 (1991).
58. David Relman Elaine Tuomanen Stanley Falkow Douglas T. Golenbock Kirsi Saukkonen Samuel D. Recognition of a bacterial adhesin by an integrin: Macrophage CR3 (α M β 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell* **61**, 1375–1382 (1990).
59. Yoshio Ishibashi, Sarah Claus & David A. Relman. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin interacts with a leukocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18). *J Exp Med*. **180**, 1225–1233 (1994).
60. Prasad, S. M., Yin, Y., Rodzinski, E., Tuomanen, E. I. & Robert Masure, H. *Identification of a Carbohydrate Recognition Domain in Filamentous Hemagglutinin from Bordetella pertussis*. <https://journals.asm.org/journal/iai> (1993).
61. Hannah, J. H., Menozzi, F. D., Renauld, G., Loch, C. & Brennan, M. J. *Sulfated Glycoconjugate Receptors for the Bordetella pertussis Adhesin Filamentous Hemagglutinin (FHA) and Mapping of the Heparin-Binding Domain on FHA*. *INFECTION AND IMMUNITY* <https://journals.asm.org/journal/iai> (1994).

62. Abramson, T., Kedem, H. & Relman, D. A. Proinflammatory and Proapoptotic Activities Associated with *Bordetella pertussis* Filamentous Hemagglutinin. *Infect Immun* **69**, 2650–2658 (2001).
63. Cotter, P. A. *et al.* Filamentous Hemagglutinin of *Bordetella bronchiseptica* Is Required for Efficient Establishment of Tracheal Colonization. *INFECTION AND IMMUNITY* vol. 66 <https://journals.asm.org/journal/iai> (1998).
64. Inatsuka, C. S., Julio, S. M. & Cotter, P. A. *Sciences of the USA 18578-18583 PNAS*. vol. 102 www.pnas.org [doi:10.1073/pnas.0507910102](https://doi.org/10.1073/pnas.0507910102) (2005).
65. Michael W. Henderson *et al.* Contribution of *Bordetella* Filamentous Hemagglutinin and Adenylate Cyclase Toxin to Suppression and Evasion of Interleukin-17-Mediated Inflammation. *Infect Immun*. **80**, 2061–2075 (2012).
66. Scheller, E. v & Cotter, P. A. *Bordetella* filamentous hemagglutinin and fimbriae: critical adhesins with unrealized vaccine potential. *FEMS Pathogens and Disease* **73**, 79 (2015).
67. Heck, D. v., Trus, B. L. & Steven, A. C. Three-Dimensional Structure of *Bordetella pertussis* Fimbriae. *J Struct Biol* **116**, 264–269 (1996).
68. Rob J. L. Willems, Han G. J. van der Heide & Frits R. Mooi. Characterization of a *Bordetella pertussis* fimbrial gene cluster which is located directly downstream of the filamentous haemagglutinin gene. *Molecular microbiology* **6**, 2661–2671 (1992).
69. Edwards, J. A., Groathouse, N. A. & Boitano, S. *Bordetella bronchiseptica* Adherence to Cilia Is Mediated by Multiple Adhesin Factors and Blocked by Surfactant Protein A. *Infect Immun* **73**, 3618–3626 (2005).
70. Geuijen, C. A. W. *et al.* Role of the *Bordetella pertussis* Minor Fimbrial Subunit, *FimD*, in Colonization of the Mouse Respiratory Tract. *INFECTION AND IMMUNITY* vol. 65 <https://journals.asm.org/journal/iai> (1997).
71. Funnell, S. G. P. & Robinson, A. A novel adherence assay for using tracheal organ cultures *Bordetella pertussis*. *FEMS Microbiology Letters* vol. 110 <https://academic.oup.com/femsle/article/110/2/197/534171> (1993).
72. Ian R. Henderson & James P. Nataro. Virulence Functions of Autotransporter Proteins. *Infect Immun* **69**, 1231–1243 (2001).
73. J A Montaraz, P Novotny & J Ivanyi. Identification of a 68-kilodalton protective protein antigen from *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun* **47**, 744–751 (1985).
74. Charles, G. *et al.* Molecular cloning and characterization of protective outer membrane protein P.69 from *Bordetella pertussis*. vol. 86 <https://www.pnas.org> (1989).
75. L. J. Li, G. Dougan, P. Novotny & I. G. Charles. P.70 pertactin, an outer-membrane protein from *Bordetella parapertussis*: cloning, nucleotide sequence and surface expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**, 409–417 (1991).
76. I R Henderson, F Navarro-Garcia & J P Nataro. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Cellpress* **6**, 370–378 (1998).

77. Wells, T. J., Tree, J. J., Ulett, G. C. & Schembri, M. A. Autotransporter proteins: novel targets at the bacterial cell surface. *FEMS* **274**, 163–172 (2007).
78. Emsley, P., McDermott, G., Charles, I. G., Fairweather, N. F. & Isaacs, N. W. Crystallographic Characterization of Pertactin, a Membrane-associated Protein from *Bordetella pertussis*. *J Mol Biol* **235**, 772–773 (1994).
79. R C Fernandez & A A Weiss. Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. *Infect Immun.* **62**, 4727–4738 (1994).
80. Loic Coutte, Rudy Antoine, Hervé Drobecq, Camille Loch & Françoise Jacob-Dubuisson. Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *EMBO J.* **20**, 5040–5048 (2001).
81. Theresa M. Finn and Diana F. Amsbaugh. Vag8, a *Bordetella pertussis* bvg-Regulated Protein. *Infect Immun.* **66**, 3985–3989 (1998).
82. Carbonetti, N. H. Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. (2010) doi:10.2217/fmb.09.133.
83. Lepesheva, A. *et al.* Different roles of conserved tyrosine residues of the acylated domains in folding and activity of RTX toxins. *Scientific Reports* | **11**, (2021).
84. P Glaser, A Danchin, D Ladant, O Barzu & A Ullmann. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: the gene and the protein. *Tokai J Exp Clin Med.* **13**, 239–252 (1988).
85. M Hackett, L Guo, J Shabanowitz, D F Hunt & E L Hewlett. Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *Science (1979)* **266**, 433–435 (1994).
86. Mohammed El-Azami-El-Idrissi, C. B. J. L. R. O. P. S. D. L. and C. L. Interaction of *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase with CD11b/CD18: Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. *J Biol Chem* **278**, 38514–38521 (2003).
87. H Sakamoto, J Bellalou, P Sebo & D Ladant. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Structural and functional independence of the catalytic and hemolytic activities. *J Biol Chem* **267**, 13598–13602 (1992).
88. P Glaser *et al.* Identification of residues essential for catalysis and binding of calmodulin in *Bordetella pertussis* adenylate cyclase by site-directed mutagenesis. *EMBO J.* **8**, 967–972 (1989).
89. D Ladant *et al.* Characterization of the calmodulin-binding and of the catalytic domains of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *J Biol Chem* **264**, 4015–4020 (1989).
90. Eby, J. C., Gray, M. C., Mangan, A. R., Donato, G. M. & Hewlett, E. L. Role of CD11b/CD18 in the Process of Intoxication by the Adenylate Cyclase Toxin of *Bordetella pertussis*. *infect immun* **80**, 850–859 (2012).
91. Uribe, K. B. *et al.* Ca²⁺ Influx and Tyrosine Kinases Trigger *Bordetella* Adenylate Cyclase Toxin (ACT) Endocytosis. Cell Physiology and Expression of the CD11b/CD18 Integrin Major Determinants of the Entry Route. (2013) doi:10.1371/journal.pone.0074248.

92. César Martín, Geraxane Gómez-Bilbao & Helena Ostolaza. Bordetella Adenylate Cyclase Toxin Promotes Calcium Entry into Both CD11b+ and CD11b- Cells through cAMP-dependent L-type-like Calcium Channels. *J Biol Chem.* **285**, 357–364 (2010).
93. Friedman, R. L., Fiederlein, R. L., Glasser, L. & Galgiani, J. N. *Bordetella pertussis Adenylate Cyclase: Effects of Affinity-Purified Adenylate Cyclase on Human Polymorphonuclear Leukocyte Functions.* *INFECTION AND IMMUNITY* vol. 55 <https://journals.asm.org/journal/iai> (1987).
94. Galgiani, J. N., Hewlett, E. L. & Friedman, R. L. *Effects of Adenylate Cyclase Toxin from Bordetella pertussis on Human Neutrophil Interactions with Coccidioides immitis and Staphylococcus aureus.* *INFECTION AND IMMUNITY* vol. 56 <https://journals.asm.org/journal/iai> (1988).
95. D L Confer & J W Eaton. Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science* . **217**, 948–950 (1982).
96. Khelef, N., Zychlinsky, A. & Guiso, N. *Bordetella pertussis Induces Apoptosis in Macrophages: Role of Adenylate Cyclase-Hemolysin.* *INFECTION AND IMMUNITY* vol. 61 <https://journals.asm.org/journal/iai> (1993).
97. Khelef, N. & Guiso, N. *Induction of macrophage apoptosis by Bordetella pertussis adenylate cyclase-hemolysin.* *FEMS Microbiology Letters* vol. 134 <https://academic.oup.com/femsle/article/134/1/27/524087> (1995).
98. Gueirard, P., Druilhe, A., Pretolani, M. & Guiso, N. *Role of Adenylate Cyclase-Hemolysin in Alveolar Macrophage Apoptosis during Bordetella pertussis Infection In Vivo.* *INFECTION AND IMMUNITY* vol. 66 <https://journals.asm.org/journal/iai> (1998).
99. Teixeira-Nunes, M. *et al.* Bacterial Nucleotidyl Cyclases Activated by Calmodulin or Actin in Host Cells: Enzyme Specificities and Cytotoxicity Mechanisms Identified to Date. (2022) doi:10.3390/ijms23126743.
100. Vojtova, J., Kamanova, J. & Sebo, P. Bordetella adenylate cyclase toxin: a swift saboteur of host defense. *Curr Opin Microbiol* **9**, 69–75 (2006).
101. Masuda, M., Minami, M., Shime, H., Matsuzawa, T. & Horiguchi, Y. In Vivo Modifications of Small GTPase Rac and Cdc42 by Bordetella Dermonecrotic Toxin. *Infect Immun* **70**, 998–1001 (2002).
102. Minako Masuda *et al.* Activation of Rho through a cross-link with polyamines catalyzed by Bordetella dermonecrotizing toxin. *EMBO J.* **19**, 521–530 (2000).
103. Horiguchi, Y. *et al.* *Bordetella bronchiseptica dermonecrotizing toxin induces reorganization of actin stress fibers through deamidation of Gln-63 of the GTP-binding protein Rho.* vol. 94 www.pnas.org. (1997).
104. Y Takai, T Sasaki & T Matozaki. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* . **8**, 153–208 (2001).
105. T Magyar, R Glávits, G D Pullinger & A J Lax. The pathological effect of the Bordetella dermonecrotic toxin in mice. *Acta Vet Hung* **48**, 397–406 (2000).
106. Susan L Brockmeier *et al.* Role of the dermonecrotic toxin of Bordetella bronchiseptica in the pathogenesis of respiratory disease in swine. *Infect Immun* . **70**, 481–490 (2002).

107. Lee, C. A. Type III secretion systems: machines to deliver bacterial proteins into eukaryotic cells? *Trends Microbiol* **5**, 148–156 (1997).
108. Ahuja, U. *et al.* Differential regulation of type III secretion and virulence genes in *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica* by a secreted anti- σ factor. (2016) doi:10.1073/pnas.1600320113.
109. Hisashi Nogawa, Asaomi Kuwae, Takeshi Matsuzawa & Akio Abe. The Type III Secreted Protein BopD in *Bordetella bronchiseptica* Is Complexed with BopB for Pore Formation on the Host Plasma Membrane. *J Bacteriol.* **186**, 3806–3813 (2004).
110. Medhekar, B., Shrivastava, R., Mattoo, S., Gingery, † Mari & Miller, J. F. *Bordetella* Bsp22 forms a filamentous type III secretion system tip complex and is immunoprotective in vitro and in vivo. (2008) doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06543.x.
111. Panina, E. , Han M, Mattoo S, Yuk M & Miller J F. Identification of a *Bordetella* type III secreted effector protein. *American Society for Microbiology* 78 (2004).
112. Mattoo, S., Yuk, M. H., Huang, L. L. & Miller, J. F. Regulation of type III secretion in *Bordetella*. *Mol Microbiol* **52**, 1201–1214 (2004).
113. Bibova, I. *et al.* RNA Biology Transcriptional profiling of *Bordetella pertussis* reveals requirement of RNA chaperone Hfq for Type III secretion system functionality Transcriptional profiling of *Bordetella pertussis* reveals requirement of RNA chaperone Hfq for Type III secretion system functionality. *RNA Biol* **12**, 175–185 (2015).
114. Huam Yuk, M., Harvill, E. T., Cotter, P. A. & Miller, J. F. *Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF- κ B activation by the Bordetella type III secretion system.* *Molecular Microbiology* vol. 35 www.sanger.ac.uk/Projects/B_pertussis (2000).
115. Yuk Jason Skinner, H. A., Reissinger, A. & Shen, H. Cells into a Semimature State Cyclase Toxin Synergize to Drive Dendritic Type III Secretion and Adenylate *Bordetella*. *J Immunol References* **173**, 1934–1940 (2004).
116. Siciliano, N. A., Skinner, J. A. & Yuk, M. H. the Initiation of a Th17 Immune Response T Cell Proliferation and + Inhibition of CD4 Macrophage Phenotype Leading to the Modulates *Bordetella bronchiseptica*. (2006) doi:10.4049/jimmunol.177.10.7131.
117. Weiss, A. A., Melton, A. R., Walker, K. E., Andraos-Selim, C. & Meidl, J. J. *Use of the Promoter Fusion Transposon Tn5 lac To Identify Mutations in Bordetella pertussis vir-Regulated Genes.* *INFECTIO AND IMMUNITY* vol. 57 https://journals.asm.org/journal/iai (1989).
118. J S Parkinson & E C Kofoid. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet.* **26**, 71–112 (1992).
119. Uhl, M. A. & Miller, J. F. *Autophosphorylation and phosphotransfer in the Bordetella pertussis BvgAS signal transduction cascade.* vol. 91 https://www.pnas.org (1994).
120. A L Perraud, v Weiss & R Gross. Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trends Microbiol .* **7**, 115–120 (1999).

121. Stibitz, S. & Yang, M.-S. *Subcellular Localization and Immunological Detection of Proteins Encoded by the vir Locus of Bordetella pertussis*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* vol. 173 <https://journals.asm.org/journal/jb> (1991).
122. B L Taylor, I B Zhulin & M S Johnson. Aerotaxis and other energy-sensing behavior in bacteria. *Annu Rev Microbiol* . **53**, 103–128 (1999).
123. M A Uhl and J F Miller. Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *EMBO J*. **15**, 1028–1036 (1996).
124. Cotter, P. A. & Dirita, V. J. *BACTERIAL VIRULENCE GENE REGULATION: An Evolutionary Perspective*. www.annualreviews.org (2000).
125. Perraud, A.-L., Kimmel, B., Weiss, V. & Gross, R. *Specificity of the BvgAS and EvgAS phosphorelay is mediated by the C-terminal HPt domains of the sensor proteins*. (1998).
126. Uhl, M. A. & Miller, J. F. *Autophosphorylation and phosphotransfer in the Bordetella pertussis BvgAS signal transduction cascade*. vol. 91 <https://www.pnas.org> (1994).
127. M A Uhl & J F Miller. Central role of the BvgS receiver as a phosphorylated intermediate in a complex two-component phosphorelay. *J Biol Chem* . **271**, 33176–33180 (1996).
128. Boucher, P. E., Menozzi, F. D. & Loch, C. The Modular Architecture of Bacterial Response Regulators: Insights into the Activation Mechanism of the BvgA Transactivator of *Bordetella pertussis*. *J Mol Biol* **241**, 363–377 (1994).
129. C R Roy, J F Miller & S Falkow. The bvgA gene of *Bordetella pertussis* encodes a transcriptional activator required for coordinate regulation of several virulence genes. *J Bacteriol* . **171**, 6338–6344 (1989).
130. Marques, R. R. & Carbonetti, N. H. *Genetic analysis of pertussis toxin promoter activation in Bordetella pertussis*. (1997).
131. Merkel, T. J., Barros, C. & Stibitz, S. *Characterization of the bvgR Locus of Bordetella pertussis*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* vol. 180 <https://journals.asm.org/journal/jb> (1998).
132. Stockbauer, K. E., Fuchslocher, B., Miller, J. F. & Cotter, P. A. *Identification and characterization of BipA, a Bordetella Bvg-intermediate phase protein*. *Molecular Microbiology* vol. 39 (2001).
133. Boulanger, A., Chen, Q., Hinton, D. M. & Stibitz, S. In vivo phosphorylation dynamics of the *Bordetella pertussis* virulence-controlling response regulator BvgA. *Mol Microbiol* **88**, 156–172 (2013).
134. B J Akerley, D M Monack, S Falkow & J F Miller. The bvgAS locus negatively controls motility and synthesis of flagella in *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol*. **174**, 980–990 (1992).
135. Guillermo Martinez de Tejada, P. A. C. U. H. A. C. B. J. A. J. J. M. and J. F. M. Neither the Bvg-phase nor the vrg6 locus of *Bordetella pertussis* is required for respiratory infection in mice. *Infect Immun*. **66**, 2762–2768 (1998).
136. B J Akerley, P. A. C. J. F. M. Ectopic expression of the flagellar regulon alters development of the *Bordetella*-host interaction. *Cell* . **80**, 611–620 (1995).

137. Coutte, L. *et al.* The multifaceted RisA regulon of *Bordetella pertussis*. *Nature Publishing Group* (2016) doi:10.1038/srep32774.
138. Heidrun Jungnitz, Nicholas P. West, Mark J. Walker, Gursharan S. Chhatwal & Carlos A. Guzmán. A Second Two-Component Regulatory System of *Bordetella bronchiseptica* Required for Bacterial Resistance to Oxidative Stress, Production of Acid Phosphatase, and In Vivo Persistence. *Infect Immun.* **66**, 4640–4650 (1998).
139. Chen, Q., Ng, V., Warfel, J. M., Merkel, T. J. & Stibitz, S. Activation of Bvg-repressed genes in *Bordetella pertussis* by RisA requires cross talk from noncooperonic histidine kinase RisK. *J Bacteriol* (2017) doi:10.1128/JB.00475-17.
140. Callan S Kaut *et al.* A novel sensor kinase is required for *Bordetella bronchiseptica* to colonize the lower respiratory tract. *Infect Immun.* **79**, 3216–3228 (2011).
141. M Ashley Hueso *et al.* *Bordetella* PlrSR regulatory system controls BvgAS activity and virulence in the lower respiratory tract. (2017) doi:10.1073/pnas.1609565114.
142. S Mattoo, A K Foreman-Wykert, P A Cotter & J F Miller. Mechanisms of *Bordetella* pathogenesis. *Front Biosci.* **6**, 168–186 (2001).
143. M Ducours *et al.* *Bordetella bronchiseptica* infection. *Med Mal Infect.* **47**, 453–458 (2017).
144. Rolin, O., Smallridge, W., Henry, M., Goodfield, L. & Place, D. Toll-Like Receptor 4 Limits Transmission of *Bordetella bronchiseptica*. *PLoS One* **9**, 85229 (2014).
145. A A Weiss & E L Hewlett. Virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Annu Rev Microbiol.* **40**, 661–686 (1986).
146. Serra, D. O. *et al.* 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. (2011) doi:10.1371/journal.pone.0028811.
147. E I Tuomanen, J Nedelman, J O Hendley & E L Hewlett. Species specificity of *Bordetella* adherence to human and animal ciliated respiratory epithelial cells. *Infect Immun.* **42**, 692–695 (1983).
148. Christie, A. B. *Infectious Diseases: Epidemiology and Clinical Practice.* (1980).
149. Savelkoul, P. H. M., Kremer, B., Kusters, J. G., van der Zeijst, B. A. M. & Gastra, W. Invasion of HeLa cells by *Bordetella bronchiseptica*. *Microb Pathog* **14**, 161–168 (1993).
150. H Schipper, G. F. K. and R. G. Epithelial cell invasion and survival of *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun.* **62**, 3008–3011 (1994).
151. Savelkoul P H, K. B. K. J. G. van der Z. B. A. G. W. Invasion of HeLa cells by *Bordetella bronchiseptica*. *Microb Pathog*, **14**, 161-168. (1993).
152. Fernández, J., Sisti, F., Bottero, D., Gaillard, M. E. & Hozbor, D. Constitutive expression of bvgR-repressed factors is not detrimental to the *Bordetella bronchiseptica*–host interaction. *Res Microbiol* **156**, 843–850 (2005).
153. A Banemann and R Gross. Phase variation affects long-term survival of *Bordetella bronchiseptica* in professional phagocytes. *Infect Immun.* **65**, 3469–3473 (1997).

154. Boris Schneider, Roy Gross & Albert Haas. Phagosome Acidification Has Opposite Effects on Intracellular Survival of *Bordetella pertussis* and *B. bronchiseptica*. *Infect Immun.* **68**, 7039–7048 (2000).
155. C A Guzman, M Rohde & K N Timmis. Mechanisms involved in uptake of *Bordetella bronchiseptica* by mouse dendritic cells. *Infect Immun.* **62**, 5538–5544 (1994).
156. C A Guzman, M Rohde, M Bock & K N Timmis. Invasion and intracellular survival of *Bordetella bronchiseptica* in mouse dendritic cells. *Infect Immun.* **62**, 5528–5537 (1994).
157. Fingermann, M. & Hozbor, D. Acid tolerance response of *Bordetella bronchiseptica* in avirulent phase. *Microbiol Res* **181**, 52–60 (2015).
158. Luu, L. D. W. *et al.* Characterisation of the *Bordetella pertussis* secretome under different media. *J Proteomics* **158**, 43–51 (2017).
159. Lan, R. *et al.* Conservation of Ancient Genetic Pathways for Intracellular Persistence Among Animal Pathogenic *Bordetellae*. (2019) doi:10.3389/fmicb.2019.02839.
160. Petráčková, D. *et al.* Transcriptional profiling of human macrophages during infection with *Bordetella pertussis*. (2020) doi:10.1080/15476286.2020.1727694.
161. Zimna, K., Medina, E., Jungnitz, H. & Guzmán, C. A. Role played by the response regulator Ris in *Bordetella bronchiseptica* resistance to macrophage killing. *FEMS Microbiol Lett* **201**, 177–180 (2001).
162. Donlan & Rodney M. *Biofilms: Microbial Life on Surfaces. Emerging Infectious Diseases* • vol. 8 <http://www.microbelibrary.org/> (2002).
163. Diego Serra *et al.* Continuous nondestructive monitoring of *Bordetella pertussis* biofilms by Fourier transform infrared spectroscopy and other corroborative techniques. *Anal Bioanal Chem* **387**, 1759–1767 (2007).
164. Gina Parise Sloan, Cheraton F. Love, Neelima Sukumar, Meenu Mishra & Rajendar Deora. The *Bordetella Bps* Polysaccharide Is Critical for Biofilm Development in the Mouse Respiratory Tract. *J Bacteriol.* **189**, 8270–8276 (2007).
165. Conover, M. S., Sloan, G. P., Love, C. F., Sukumar, N. & Deora, R. The *Bps* polysaccharide of *Bordetella pertussis* promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin. *J Bacteriol.* **192**, 1439–1455. (2010) doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07297.x.
166. Conover, M. S. *et al.* *BpsR* Modulates *Bordetella* Biofilm Formation by Negatively Regulating the Expression of the *Bps* Polysaccharide. (2012) doi:10.1128/JB.06020-11.
167. Parise, G., Mishra, M., Itoh, Y., Romeo, T. & Deora, R. Role of a Putative Polysaccharide Locus in *Bordetella* Biofilm Development. *J Bacteriol* **189**, 750–760 (2007).
168. Serra, D. O. *et al.* Proteome approaches combined with Fourier transform infrared spectroscopy revealed a distinctive biofilm physiology in *Bordetella pertussis*. (2008) doi:10.1002/pmic.200800218.

169. Meenu Mishra, Gina Parise, Kara D. Jackson, Daniel J. Wozniak & Rajendar Deora. The BvgAS Signal Transduction System Regulates Biofilm Development in *Bordetella*. *J Bacteriol.* **187**, 1474–1484 (2005).
170. Irie, Y., Mattoo, S. & Yuk, M. H. The Bvg Virulence Control System Regulates Biofilm Formation in *Bordetella bronchiseptica*. *Bordetella* species utilize the BvgAS (*Bordetella* virulence gene) two-component signal transduction system to sense the environment and regulate gene expression among at least three phases: a virulent Bvg phase, a nonvirulent Bvg phase, and an intermediate Bvg i phase. Genes expressed in the Bvg phase encode known virulence factors. *J Bacteriol* **186**, 5692–5698 (2004).
171. Sisti, F., Ha, D.-G., O’Toole, G. A., Hozbor, D. & Fernández, J. Cyclic-di-GMP signalling regulates motility and biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiology (Reading)* **159**, 869–79 (2013).
172. Nicholson, T. L., Conover, M. S. & Deora, R. Transcriptome Profiling Reveals Stage-Specific Production and Requirement of Flagella during Biofilm Development in *Bordetella bronchiseptica*. *PLoS One* **7**, 49166 (2012).
173. Hoffman, C. *et al.* *Bordetella* adenylate cyclase toxin interacts with filamentous haemagglutinin to inhibit biofilm formation in vitro. *Mol Microbiol* **1032**, 214–228 (2017).
174. Nishikawa, S. *et al.* The bvg-repressed gene *brtA*, encoding biofilm-associated surface adhesin, is expressed during host infection by *Bordetella bronchiseptica*. (2016) doi:10.1111/1348-0421.12356.
175. Ambrosis, N., Boyd, C. D., O’toole, G. A., Fernández, J. & Sisti, F. Homologs of the LapD-LapG c-di-GMP Effector System Control Biofilm Formation by *Bordetella bronchiseptica*. (2016) doi:10.1371/journal.pone.0158752.
176. Conover, M. S., Mishra, M. & Deora, R. □. Extracellular DNA Is Essential for Maintaining *Bordetella* Biofilm Integrity on Abiotic Surfaces and in the Upper Respiratory Tract of Mice. *PLoS One* **6**, 16861 (2011).
177. Parise, G., Mishra, M., Itoh, Y., Romeo, T. & Deora, R. Role of a Putative Polysaccharide Locus in *Bordetella* Biofilm Development. *J Bacteriol* **189**, 750–760 (2007).
178. Yasuhiko Irie, Andrew Preston & Ming H. Yuk. Expression of the Primary Carbohydrate Component of the *Bordetella bronchiseptica* Biofilm Matrix Is Dependent on Growth Phase but Independent of Bvg Regulation. *J Bacteriol.* **188**, 6680–6687 (2006).
179. Dustin J. Little *et al.* The Protein BpsB Is a Poly-β-1,6-N-acetyl-d-glucosamine Deacetylase Required for Biofilm Formation in *Bordetella bronchiseptica*. *J Biol Chem.* **290**, 22827–22840 (2015).
180. Samuel Steiner, Christian Lori, Alex Boehm & Urs Jenal. Allosteric activation of exopolysaccharide synthesis through cyclic di-GMP-stimulated protein–protein interaction. *EMBO J.* **32**, 354–368 (2013).
181. Whitney, J. C. & Howell, P. L. Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria. (2013) doi:10.1016/j.tim.2012.10.001.

182. Wang, X., Preston Iii, J. F. & Romeo, T. The pgaABCD Locus of Escherichia coli Promotes the Synthesis of a Polysaccharide Adhesin Required for Biofilm Formation. *J Bacteriol* **186**, 2724–2734 (2004).
183. Cuong Vuong Jovanka M Voyich, E. R. F. K. R. B. A. R. W. F. R. D. M. O. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects Staphylococcus epidermidis against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol.* **6**, 269–275 (2004).
184. Sarah E. Cramton, Christiane Gerke, Norbert F. Schnell, Wright W. Nichols & Friedrich Götz. The Intercellular Adhesion (ica) Locus Is Present in Staphylococcus aureus and Is Required for Biofilm Formation. *Infect Immun.* **67**, 5427–5433 (1999).
185. Mack, D. *et al.* The Intercellular Adhesin Involved in Biofilm Accumulation of Staphylococcus epidermidis Is a Linear-1,6-Linked Glucosaminoglycan: Purification and Structural Analysis. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* vol. 178 <https://journals.asm.org/journal/jb> (1996).
186. Itoh, Y. *et al.* Roles of pgaABCD Genes in Synthesis, Modification, and Export of the Escherichia coli Biofilm Adhesin Poly-1,6-N-Acetyl-D-Glucosamine. *J Bacteriol* **190**, 3670–3680 (2008).
187. Cohen, S. P., Hachler, H. & Levy', S. B. Genetic and Functional Analysis of the Multiple Antibiotic Resistance (mar) Locus in Escherichia coli. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* <https://journals.asm.org/journal/jb> (1993).
188. Cheung, A. L., Nishina, K. A., Pilar, M., Pous, T. & Tamber, S. The SarA protein family of Staphylococcus aureus. (2008).
189. Anthony O. Gaca, Cristina Colomer-Winter & José A. Lemos. Many Means to a Common End: the Intricacies of (p)ppGpp Metabolism and Its Control of Bacterial Homeostasis. *J Bacteriol.* **197**, 1146–1156 (2015).
190. Kentaro Sugisaki *et al.* Role of (p)ppGpp in biofilm formation and expression of filamentous structures in Bordetella pertussis. *Microbiology (Reading)* . **159**, 1379–1389 (2013).
191. P. Ross *et al.* Regulation of cellulose synthesis in Acetobacter xylinum by cyclic diguanylic acid. *Nature* **325**, 279–281 (1987).
192. Jenal, U., Reinders, A. & Lori, C. Cyclic di-GMP: Second messenger extraordinaire. *Nat Rev Microbiol* **15**, 271–284 (2017).
193. Ute Römling, Michael Y. Galperin & Mark Gomelsky. Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. *Microbiol Mol Biol Rev.* **77**, 1–52 (2013).
194. Wolfe, A. J. & Visick, K. L. Get the Message Out: Cyclic-Di-GMP Regulates Multiple Levels of Flagellum-Based Motility. *J Bacteriol* **190**, 463–475 (2008).
195. David K. R. Karaolis *et al.* c-di-GMP (3'-5'-Cyclic Diguanylic Acid) Inhibits Staphylococcus aureus Cell-Cell Interactions and Biofilm Formation. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**, 1029–1038 (2005).
196. Jenal, U. & Malone, J. Mechanisms of Cyclic-di-GMP Signaling in Bacteria. (2006) doi:10.1146/annurev.genet.40.110405.090423.

197. Tilman Schirmer. C-di-GMP Synthesis: Structural Aspects of Evolution, Catalysis and Regulation. *J Mol Biol* **428**, 3683–3701 (2016).
198. Paul, R. *et al.* Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. (2004) doi:10.1101/gad.289504.
199. Trevor E. Randall *et al.* Sensory Perception in Bacterial Cyclic Diguanylate Signal Transduction. *J Bacteriol.* **204**, e00433-00421 (2022).
200. Gomelsky, M. A Zinc Lock on GGDEF Domain Dimerization Inhibits E. coli Biofilms. *Structure* **21**, 1067–1068 (2013).
201. Tchigvintsev, A. *et al.* Structural Insight into the Mechanism of c-di-GMP Hydrolysis by EAL Domain Phosphodiesterases. *J Mol Biol* **402**, 524–538 (2011).
202. Amit Sundriyal *et al.* Inherent regulation of EAL domain-catalyzed hydrolysis of second messenger cyclic di-GMP. *J Biol Chem* **289**, 6978–6990 (2014).
203. Michael Y. Galperin and Eugene V. Koonin. Divergence and Convergence in Enzyme Evolution. *J Biol Chem.* **287**, 21–28 (2012).
204. Galperin, M. Y., Natale, D. A., Aravind, L. & Koonin, E. v. *A specialized version of the HD hydrolase domain implicated in signal transduction.* (1999).
205. Ryan, R. P. *et al.* Cell-cell signal-dependent dynamic interactions between HD-GYP and GGDEF domain proteins mediate virulence in *Xanthomonas campestris*. (2010) doi:10.1073/pnas.0912839107.
206. Chan, C. *et al.* *Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase.* www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0406134101 (2004).
207. Marina Tarutina, Dmitri A Ryjenkov & Mark Gomelsky. An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. *J Biol Chem* . **281**, 34751–34758 (2006).
208. Andrew J Schmidt, Dmitri A Ryjenkov & Mark Gomelsky. The Ubiquitous Protein Domain EAL Is a Cyclic Diguanylate-Specific Phosphodiesterase: Enzymatically Active and Inactive EAL Domains. *J Bacteriol* . **187**, 4774–4781 (2005).
209. Matthias Christen, Beat Christen, Marc Folcher, Alexandra Schauerte & Urs Jenal. Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J Biol Chem* . **280**, 30829–30837 (2005).
210. Habazettl, J., Allan, M. G., Jenal, U. & Grzesiek, S. Solution Structure of the PilZ Domain Protein PA4608 Complex with Cyclic di-GMP Identifies Charge Clustering as Molecular Readout. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 14304–14314 (2011).
211. Schumacher, M. A. & Zeng, W. Structures of the activator of *K. pneumonia* biofilm formation, MrkH, indicates PilZ domains involved in c-di-GMP and DNA binding. (2016) doi:10.1073/pnas.1607503113.
212. Duerig, A. *et al.* Second messenger-mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression. (2008) doi:10.1101/gad.502409.

213. Tschowri, N. *et al.* Tetrameric c-di-GMP Mediates Effective Transcription Factor Dimerization to Control *Streptomyces* Development. *Cell* **158**, 1136–1147 (2014).
214. Smith, K. D., Lipchock, S. v, Livingston, A. L., Shanahan, C. A. & Strobel, S. A. Structural and biochemical determinants of ligand binding by the c-di-GMP riboswitch †, ‡ NIH Public Access. (2010) doi:10.1021/bi100671e.
215. Shanahan, C. A., Gaffney, B. L., Jones, R. A. & Strobel, S. A. Differential analog binding by two classes of c-di-GMP riboswitches. (2011) doi:10.1021/ja204650q.
216. Dorit Amikam & Michael Y Galperin. PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* **22**, 3–6 (2006).
217. W Morgan, J. L., McNamara, J. T. & Zimmer, J. Mechanism of activation of bacterial cellulose synthase by cyclic di-GMP. (2014) doi:10.1038/nsmb.2803.
218. Christen, M. *et al.* *DgrA is a member of a new family of cyclic diguanosine monophosphate receptors and controls flagellar motor function in Caulobacter crescentus.* www.pnas.org/cgi/content/full/ (2007).
219. Martínez-Granero, F. *et al.* Identification of flgZ as a Flagellar Gene Encoding a PilZ Domain Protein That Regulates Swimming Motility and Biofilm Formation in *Pseudomonas*. (2014) doi:10.1371/journal.pone.0087608.
220. Jason T. Pratt, Rita Tamayo, Anna D. Tischler & ndrew Camilli. PilZ Domain Proteins Bind Cyclic Diguanylate and Regulate Diverse Processes in *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem.* **282**, 12860–12870 (2007).
221. Yang, F. *et al.* The Degenerate EAL-GGDEF Domain Protein Filp Functions as a Cyclic di-GMP Receptor and Specifically Interacts with the PilZ-Domain Protein PXO_02715 to Regulate Virulence in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **27**, 578–589 (2014).
222. Christen, M., Christen, B., Folcher, M., Schauerte, A. & Jenal, U. Identification and Characterization of a Cyclic di-GMP-specific Phosphodiesterase and Its Allosteric Control by GTP. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 30829–30837 (2005).
223. Zhi Li, Jui-Hui Chen, Yue Hao & Satish K. Nair. Structures of the PelD Cyclic Diguanylate Effector Involved in Pellicle Formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Biol Chem.* **287**, 30191–30204 (2012).
224. Newell, P. D., Monds, R. D. & O'toole, G. A. *LapD is a bis-(3,5)-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by Pseudomonas fluorescens Pf0-1.* www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0808933106 (2009).
225. Navarro M *et al.* Structural Basis for c-di-GMP-Mediated Inside-Out Signaling Controlling Periplasmic Proteolysis. *PLoS Biol.* **9**, e1000588 (2011).
226. Fazli, M. *et al.* The CRP/FNR family protein Bcam1349 is a c-di-GMP effector that regulates biofilm formation in the respiratory pathogen *Burkholderia cenocepacia* mi_7814 327..341. (2011) doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07814.x.
227. Matsuyama, B. Y. *et al.* Mechanistic insights into c-di-GMP-dependent control of the biofilm regulator FleQ from *Pseudomonas aeruginosa*. (2016) doi:10.1073/pnas.1523148113.

228. Yu-Chuan Wang *et al.* Nucleotide binding by the widespread high-affinity cyclic di-GMP receptor MshEN domain. *Nat Commun* . **31**, 12481 (2016).
229. Krasteva, P. v *et al.* Vibrio cholerae VpsT regulates matrix production and motility by directly sensing cyclic di-GMP *. (2010) doi:10.1126/science.1181185.
230. Sudarsan, N. *et al.* Riboswitches in Eubacteria Sense the Second Messenger Cyclic Di-GMP HHS Public Access. *Science (1979)* **321**, 411–413 (2008).
231. Regine Hengge. *Nature Reviews | Microbiology*. www.nature.com/reviews/micro (2009).
232. Sarenko, O. *et al.* More than Enzymes That Make or Break Cyclic Di-GMP-Local Signaling in the Interactome of GGDEF/EAL Domain Proteins of Escherichia coli. *mBio*. **8**, (2017).
233. Dahlstrom, K. M. & O’toole, G. A. A Symphony of Cyclases: Specificity in Diguanylate Cyclase Signaling. (2017) doi:10.1146/annurev-micro-090816-093325.
234. Krasteva, P. V. *et al.* Insights into the structure and assembly of a bacterial cellulose secretion system. (2017) doi:10.1038/s41467-017-01523-2.
235. Amikam, D. & Galperin, M. Y. BIOINFORMATICS DISCOVERY NOTE PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. **22**, 3–6 (2006).
236. Anja M. Richte *et al.* Local c-di-GMP Signaling in the Control of Synthesis of the E. coli Biofilm Exopolysaccharide pEtN-Cellulose. *J Mol Biol*. **432**, 4576–4595 (2020).
237. Sandra Lindenberg, Gisela Klauck, Christina Pesavento, Eberhard Klauck & Regine Hengge. The EAL domain protein YciR acts as a trigger enzyme in a c-di-GMP signalling cascade in E. coli biofilm control. *EMBO J*. **32**, 2001–2014 (2013).
238. Hengge, R. Trigger phosphodiesterases as a novel class of c-di-GMP effector proteins. (2016) doi:10.1098/rstb.2015.0498.
239. Belhart, K. *et al.* Bordetella bronchiseptica diguanylate cyclase BdcA regulates motility and is important for the establishment of respiratory infection in mice. *J Bacteriol* (2019) doi:10.1128/JB.00011-19.
240. María de la Paz Gutierrez, Ting Y Wong, F. H. D., Julieta Fernández & Federico Sisti. Cyclic di-GMP Regulates the Type III Secretion System and Virulence in Bordetella bronchiseptica. *nfect Immun* . (2022).
241. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403–410 (1990).
242. Bairoch, A. *et al.* The Universal Protein Resource (UniProt). (2005) doi:10.1093/nar/gki070.
243. Baek, M. *et al.* Accurate prediction of protein structures and interactions using a 3-track neural network Europe PMC Funders Group. *Science (1979)* (2021) doi:10.1126/science.abj8754.
244. Fabian Sievers & Desmond G. Higgins. Clustal Omega. *Current protocols in Bioinformatic* (2014).
245. Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J.-M. & Brenner, S. E. WebLogo: A Sequence Logo Generator. (2004) doi:10.1101/gr.849004.

246. Pettersen EF *et al.* UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**, 1605–1612 (2004).
247. Jumper, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583 (2021).
248. Newell, P. D., Yoshioka, S., Hvorecny, K. L., Monds, R. D. & O’Toole, G. A. Systematic analysis of diguanylate cyclases that promote biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *J Bacteriol* **193**, 4685–4698 (2011).
249. Rudy Antoine & Camille Loch. Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from Gram-positive organisms. *Mol Microbiol* (1992).
250. H. Jane Dyson; Peter E. Wright. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 197–208 (2005).
251. Chan, C. *et al.* Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. (2004).
252. Paul Wassmann *et al.* Structure of BeF3- -modified response regulator PleD: implications for diguanylate cyclase activation, catalysis, and feedback inhibition. *CellPress Structure* . **15**, 915–927 (2007).
253. Matthias Christen, Beat Christen, Marc Folcher, Alexandra Schauerte & Urs Jenal. Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J Biol Chem* . **280**, 30829–30837 (2005).
254. Geoffrey G, Etch Christoph S, Goblursula V & Winkler A. Long-range allosteric signaling in red light-regulated diguanylyl cyclases. *Sci Adv* **3**, (2017).
255. Peter D. Newell, Shiro Yoshioka, Kelli L. Hvorecny, Russell D. Monds & George A. O’Toole. Systematic Analysis of Diguanylate Cyclases That Promote Biofilm Formation by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *J Bacteriol*. **193**, 4685–4698 (2011).
256. Cattelan, N., Dubey, P., Arnal, L., Yantorno, O. M. & Deora, R. *Bordetella* biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *FEMS Pathogens and Disease* **74**, 108 (2016).
257. B J Akerley & J F Miller. Flagellin gene transcription in *Bordetella bronchiseptica* is regulated by the BvgAS virulence control system. *J Bacteriol*. **175**, 3468–3479 (1993).
258. Chen, Q. & Stibitz, S. The BvgASR virulence regulon of *Bordetella pertussis*. *Curr Opin Microbiol* **47**, 74–81 (2019).
259. Rajendar Deora. Regulación diferencial del gen *bipA* de *Bordetella* : roles distintos para diferentes sitios de unión de BvgA. *J Bacteriol*. **184**, 6942–6951 (2002).
260. Dmitri A Ryjenkov, Roger Simm, Ute Römling & Mark Gomelsky. The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *J Biol Chem* **281**, 30310–30314 (2006).
261. Trevor H. Stenson, Andrew G. Allen, Jehan A. al-Meer, Duncan Maskell & Mark S. Peppler. *Bordetella pertussis* *risA*, but Not *risS*, Is Required for Maximal Expression of Bvg-Repressed Genes. *Infect Immun*. **73**, 5995–6004 (2005).

262. Mckee, R. W., Harvest, C. K. & Tamayo, R. Cyclic Diguanylate Regulates Virulence Factor Genes via Multiple Riboswitches in *Clostridium difficile*. (2018) doi:10.1128/mSphere.00423-18.
263. Benjamin R. Pursley *et al.* Cyclic di-GMP Regulates TfoY in *Vibrio cholerae* To Control Motility by both Transcriptional and Posttranscriptional Mechanisms. *J Bacteriol.* **200**, e00578 (2018).
264. Martina Valentini & Alain Filloux. Multiple Roles of c-di-GMP Signaling in Bacterial Pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* **73**, 387–406 (2019).
265. Lamberti, Y. *et al.* Proteome analysis of *Bordetella pertussis* isolated from human macrophages. *J Proteomics* **136**, 55–67 (2016).
266. Fingerhann, M. & Hozbor, D. Acid tolerance response of *Bordetella bronchiseptica* in avirulent phase. *Microbiol Res* **181**, 52–60 (2015).
267. Cafiero, J. H., Lamberti, Y. A., Surmann, K., Vecerek, B. & Rodriguez, M. E. A *Bordetella pertussis* MgtC homolog plays a role in the intracellular survival. (2018) doi:10.1371/journal.pone.0203204.
268. Ahmad, I., Lamprokostopoulou, A., Guyon, L., Streck, S. & Barthel, E. Complex c-di-GMP Signaling Networks Mediate Transition between Virulence Properties and Biofilm Formation in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *PLoS One* **6**, 28351 (2011).
269. Hemantha Kulesekara *et al.* Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *PNAS* **103**, 2839–2844 (2006).
270. Mirosław Tarnawski, Thomas R M Barends & Ilme Schlichting. Structural analysis of an oxygen-regulated diguanylate cyclase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **71**, 2158–2177 (2015).
271. Foster & John W. The Acid Tolerance Response of *Salmonella typhimurium* Involves Transient Synthesis of Key Acid Shock Proteins. *J Bacteriol* **175**, 1981–1987 (1993).
272. Kobayashi, H., Suzuki, T. & Unemoto, T. Streptococcal cytoplasmic pH is regulated by changes in amount and activity of a proton-translocating ATPase. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 627–630 (1986).
273. Richard M. Johnson, Zachary M. Nash, Margaret R. Dedloff, John C. Shook & Peggy A. Cotter. DegP Initiates Regulated Processing of Filamentous Hemagglutinin in *Bordetella bronchiseptica*. *mBio.* 2021 May-Jun; 12(3): e01465-21. **12**, e01465-21 (2021).
274. Hwee Siang Lee, Feiyu Gu, Shi Min Ching, Yulin Lam & Kim Lee Chua. CdpA Is a *Burkholderia pseudomallei* Cyclic di-GMP Phosphodiesterase Involved in Autoaggregation, Flagellum Synthesis, Motility, Biofilm Formation, Cell Invasion, and Cytotoxicity. *Infect Immun.* **78**, 1832–1840 (2010).
275. Levi, A., Folcher, M., Jenal, U. & Shuman, H. A. Cyclic Diguanylate Signaling Proteins Control Intracellular Growth of *Legionella pneumophila*. *mBio* **2**, e00316-10 (2011).
276. Mylisa R. Pilione & Eric T. Harvill. The *Bordetella bronchiseptica* Type III Secretion System Inhibits Gamma Interferon Production That Is Required for Efficient Antibody-Mediated Bacterial Clearance. *Infect Immun.* **74**, 1043–1049 (2006).

277. Yuk Jason A Skinner, M. H., Pilonie, M. R. & Shen, H. Persistence Immunosuppression and Bacterial Dendritic Cell Migration Resulting in Type III Secretion Modulates Bordetella. *J Immunol References* **175**, 4647–4652 (2005).
278. Yuk Jason A Skinner, Ming H, Pilonie, Mylisa R & Shen, H. Bordetella type III secretion modulates dendritic cell migration resulting in immunosuppression and bacterial persistence. *J Immunol References* **175**, 4647–4652 (2005).
279. Huam Yuk, M., Harvill, E. T., Cotter, P. A. & Miller, J. F. Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF-kB activation by the Bordetella type III secretion system. *Mol Microbiol* **35**, 991–1004 (2002).
280. Ivana Malcova *et al.* Lipid binding by the N-terminal motif mediates plasma membrane localization of Bordetella effector protein BteA. *J Biol Chem.* (2021).
281. Kuwae, A., Momose, F., 1□, K. N., Suyama, Y. & Abe, A. BteA Secreted from the Bordetella bronchiseptica Type III Secetion System Induces Necrosis through an Actin Cytoskeleton Signaling Pathway and Inhibits Phagocytosis by Macrophages. (2016) doi:10.1371/journal.pone.0148387.
282. Kurushima, J., Kuwae, A. & Abe, A. The Type III Secreted Protein BspR Regulates the Virulence Genes in Bordetella bronchiseptica. *PLoS One* **7**, 38925 (2012).
283. Ahuja, U. *et al.* Differential regulation of type III secretion and virulence genes in Bordetella pertussis and Bordetella bronchiseptica by a secreted anti-σ factor. (2016) doi:10.1073/pnas.1600320113.
284. Dienstbier, A., Amman, F., Štipl, D., Petráčková, D. & Večerek, B. Comparative Integrated Omics Analysis of the Hfq Regulon in Bordetella pertussis. *International Journal of Molecular Sciences Article* (2019) doi:10.3390/ijms20123073.
285. Vogel, J. & Luisi, B. F. Hfq and its constellation of RNA. (2011) doi:10.1038/nrmicro2615.
286. Zhang, W. *et al.* The Multiple Regulatory Relationship Between RNA-Chaperone Hfq and the Second Messenger c-di-GMP. (2021) doi:10.3389/fmicb.2021.689619.
287. Bellows, L. E., Koestler, B. J., Karaba, S. M., Waters, C. M. & Lathem, W. W. Hfq-dependent, co-ordinate control of cyclic diguanylate synthesis and catabolism in the plague pathogen *Yersinia pestis*. (2012) doi:10.1111/mmi.12011.
288. Zhao, X., Koestler, B. J., Waters, C. M. & Hammer, B. K. Post-transcriptional activation of a diguanylate cyclase by quorum sensing small RNAs promotes biofilm formation in *Vibrio cholerae*. (2013) doi:10.1111/mmi.12325.
289. Hammer, B. K. & Bassler, B. L. *Regulatory small RNAs circumvent the conventional quorum sensing pathway in pandemic Vibrio cholerae.* <https://www.pnas.org> (2007).
290. Petra Pusic *et al.* Harnessing Metabolic Regulation to Increase Hfq-Dependent Antibiotic Susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.* (2018).
291. Mühl, H. *et al.* *Expression and release of chemokines associated with apoptotic cell death in human promonocytic U937 cells and peripheral blood mononuclear cells.* (1999).

292. Michael Wilson, Robert Seymour & Brian Henderson. Bacterial Perturbation of Cytokine Networks. *Infect Immun.* **66**, 2401–2409 (1998).
293. Tzvia Abramson, Hassya Kedem & David A. Relman. Proinflammatory and Proapoptotic Activities Associated with Bordetella pertussis Filamentous Hemagglutinin. *Infect Immun.* **69**, 2650–2658 (2001).
294. E T Harvill, P A Cotter & J F Miller. Pregenomic comparative analysis between bordetella bronchiseptica RB50 and Bordetella pertussis tohama I in murine models of respiratory tract infection. *Infect Immun.* **67**, 6109–6118 (1999).
295. Preston, A. *et al.* Bordetella bronchiseptica PagP is a Bvg-regulated lipid A palmitoyl transferase that is required for persistent colonization of the mouse respiratory tract. *Molecular Microbiology* vol. 48 (2003).
296. Valorie C Burns, Elizabeth J Pishko, Andrew Preston, Duncan J Maskell & Eric T Harvill. Role of Bordetella O antigen in respiratory tract infection. *Infect Immun.* **71**, 86–94 (2003).
297. A Pereira AE *et al.* Humoral and cellular immune responses in BALB/c and C57BL/6 mice immunized with cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens, in acute experimental Trypanosoma cruzi infection. (2005) doi:10.1007/s00436-005-1336-4.
298. Liu, T., Nishimura, H., Matsuguchi, T. & Yoshikai, Y. Differences in Interleukin-12 and -15 Production by Dendritic Cells at the Early Stage of Listeria monocytogenes Infection between BALB/c and C57 BL/6 Mice. *Cell Immunol* **202**, 31–40 (2000).
299. Boping Liu, Ghee Chong Koo, Eu Hian Yap, Kim Lee Chua & Yunn-Hwen Gan. Model of Differential Susceptibility to Mucosal Burkholderia pseudomallei Infection. *Infect Immun.* **70**, 504–511 (2002).
300. J Wakeham & J Wang, Z. X. Genetically determined disparate innate and adaptive cell-mediated immune responses to pulmonary Mycobacterium bovis BCG infection in C57BL/6 and BALB/c mice. *Infect Immun.* **68**, 6946–6953 (2000).
301. Mosley, Y.-Y. C., Lu, F. & Hogenesch, H. Differences in innate IFN γ and IL-17 responses to Bordetella pertussis between BALB/c and C57BL/6 mice: role of $\gamma\delta$ T cells, NK cells, and dendritic cells. (2017) doi:10.1007/s12026-017-8957-4.
302. Pádraig J. Ross, Ed C. Lavelle, Kingston H. G. Mills & Aoife P. Boyd. 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. *Infect Immun.* **72**, 1568–1579 (2004).
303. Peter McGuirk, Chantelle McCann & Kingston H.G. Mills. Pathogen-specific T Regulatory 1 Cells Induced in the Respiratory Tract by a Bacterial Molecule that Stimulates Interleukin 10 Production by Dendritic Cells. *J Exp Med.* **195**, 221–231 (2002).
304. Jarnicki, A. *et al.* Toll-like receptor 4-mediated innate IL-10 activates antigen-specific regulatory T cells and confers resistance to Bordetella pertussis by inhibiting inflammatory pathology. *J Immunol* **171**, 3119–3127 (2003).

305. Lira Wiekowski, S. A. *et al.* Lungkine Lacking Expression of the CXC Chemokine Impaired Pulmonary Host Defense in Mice. (2001) doi:10.4049/jimmunol.166.5.3362.
306. Sato, S. & Bergeron, M. G. Monocyte/Macrophage Recruitment Pneumococcal Pneumonia-Induced Role of Chemokines and Formyl Peptides in. *J Immunol References* **166**, 7353–7361 (2001).
307. Kazuhiro Tateda *et al.* CXC Chemokine Receptor CXCR2 Is Essential for Protective Innate Host Response in Murine *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *Infect Immun.* 2000 **68**, 4289–4296 (2000).
308. Wilson, J. M. *et al.* Infection in Mouse Lung influenzae Haemophilus Immune Responses to Toll-Like Receptor 4 Mediates Innate. (2002) doi:10.4049/jimmunol.168.2.810.
309. Kazuhiro Tateda *et al.* Chemokine-Dependent Neutrophil Recruitment in a Murine Model of Legionella Pneumonia: Potential Role of Neutrophils as Immunoregulatory Cells. *Infect Immun.* **69**, 2017–2024 (2001).
310. Daniel P. Widney *et al.* CXCR3 and Its Ligands Participate in the Host Response to *Bordetella bronchiseptica* Infection of the Mouse Respiratory Tract but Are Not Required for Clearance of Bacteria from the Lung. *Infect Immun.* **73**, 485–493 (2005).
311. v Appay & Rowland-Jones. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol.* **22**, 83–87 (2001).
312. Tracy L. Nicholson *et al.* The *Bordetella bronchiseptica* Type III Secretion System Is Required for Persistence and Disease Severity but Not Transmission in Swine. *Infect Immun.* **82**, 1092–1103 (2014).
313. Wong, T. Y. *et al.* Analysis of the In Vivo Transcriptome of *Bordetella pertussis* during Infection of Mice. (2019) doi:10.1128/mSphereDirect.
314. van Beek, L. F. *et al.* Adaptation of *Bordetella pertussis* to the Respiratory Tract. *The Journal of Infectious Disease* **2018**, 217 (2018).
315. Catrina B. Forde, Xiaoju Shi, Jingli Li & Mark Roberts. *Bordetella bronchiseptica*-Mediated Cytotoxicity to Macrophages Is Dependent on bvg-Regulated Factors, Including Pertactin. *Infect Immun.* **67**, 5972–5978 (1999).
316. Dworkin, M. S. *et al.* 336 patients enrolled in the ASD project since to 3. *Clinical Infectious Diseases* vol. 8 <https://academic.oup.com/cid/article/28/5/1095/324378> (1997).
317. Hellwig, S. M. M., Hazenbos, L. W., van de Winkel, J. G. J. & Mooi, F. R. *Evidence for an intracellular niche for Bordetella pertussis in broncho-alveolar lavage cells of mice.* <https://academic.oup.com/femspd/article/26/3-4/203/637370> (1999) doi:10.1111/j.1574-695X.1999.tb01391.x.
318. Kamanova, J. *Bordetella* Type III Secretion Injectosome and Effector Proteins. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* | www.frontiersin.org **10**, 466 (2020).
319. Kozak, N. A., Mattoo, S., Foreman-Wykert, A. K., Whitelegge, J. P. & Miller, J. F. Interactions between Partner Switcher Orthologs BtrW and BtrV Regulate Type III Secretion in *Bordetella*. *J Bacteriol* **187**, 5665–5676 (2005).

320. Karine Le Blay, Pascale Gueirard, Nicole Guiso & Richard Chaby. Antigenic polymorphism of the lipopolysaccharides from human and animal isolates of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiology (Reading)* . **143**, 1433–1441 (1997).
321. Simon, R., Priefer, U. & Puhl, A. *A BROAD HOST RANGE MOBILIZATION SYSTEM FOR IN VIVO GENERIC ENGINEERING: TRANSPOSON MUTAGENESIS IN GRAM NEGATIVE BACTERIA*. <http://www.nature.com/naturebiotechnology> (1983).
322. Floyd R. Bryant. Construction of a Recombinase-deficient Mutant recA Protein That Retains Single-stranded DNA-dependent ATPase Activity. *Journal of Biological Chemistry*. (1987).
323. Nathalie Dautin, Gouzel Karimova, Agnes Ullmann & Daniel Ladant. Sensitive Genetic Screen for Protease Activity Based on a Cyclic AMP Signaling Cascade in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **182**, 7060–7066 (2000).
324. Robert M. Q. Shanks, Nicky C. Caiazza, Shannon M. Hinsa, Christine M. Toutain & George A. O’Toole. *Saccharomyces cerevisiae*-based molecular tool kit for manipulation of genes from gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **72**, 5027–5036 (2006).
325. U K Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* . **227**, 680–685 (1970).
326. Gaillard ME, Bottero D, Castuma C, L Ale & Hozbor D. Laboratory adaptation of *Bordetella pertussis* is associated with the loss of type three secretion system functionality. *Infect Immun.* **79**, 3677–3682 (2011).
327. Wong, F. *et al.* Benchmarking AlphaFold-enabled molecular docking predictions for antibiotic discovery. *Mol Syst Biol* **18**, 11081 (2022).
328. Sisti, F., Ha, D.-G., O’Toole, G. A., Hozbor, D. & Fernández, J. Cyclic-di-GMP signalling regulates motility and biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiology (Reading)* **159**, 869–79 (2013).
329. Scot P. Ouellette, Gouzel Karimova, Marilynne Davi & Daniel Ladant. Analysis of Membrane Protein Interactions with a Bacterial Adenylate Cyclase–Based Two-Hybrid (BACTH) Technique. *Curr Protoc* (2017).
330. Tracy L Nicholson, Anne M Buboltz, Eric T Harvill & Susan L Brockmeier. Microarray and functional analysis of growth phase-dependent gene regulation in *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun* . **77**, 4221–4231 (2009).
331. Peggy A Cotter & Allison M Jones. Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Cell Press* **11**, 367–373 (2003).