



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

**Estudio del rol del segundo mensajero c-di-GMP
en la regulación de fenotipos asociados a la
patogénesis de *Bordetella pertussis***

Tesista: Lic. Federico Zacca

Director/a: Dr. Federico Sisti

Año: 2023

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

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Federico Sisti y la Dra. Julieta Fernández (Fede y Juli), por formar y permitirme ser parte de un grupo de trabajo donde se fomenta el intercambio constante de ideas, la colaboración y el compañerismo entre sus miembros. Además, y quizás lo más importante, les agradezco por su calidad humana y el apoyo y la comprensión que me brindaron en todo momento.

A todos mis compañeros becarios del grupo cdG: Nico, Paz, Kei, Sabri y Agus, por su disposición a dar siempre una mano y por haber hecho este camino más divertido.

A toda la comunidad del IBBM, especialmente a los investigadores y becarios de R3, que me recibieron como uno más en su laboratorio en el regreso post-pandemia.

A mi familia y amigos, que me apoyan incondicionalmente.

A Marti, por compartir la vida conmigo, por escucharme, por bancarme, por acompañarme.

ABREVIATURAS

PRN: Pertactina

Fim: Fimbria

FHA: Hemaglutinina filamentosa

ACT: Adenilato ciclasa

TDN: Toxina dermonecrótica

SST3: Sistema de secreción tipo 3

LPS: lipopolisacárido

LOS: lipooligosacárido

UFC: Unidades formadoras de colonias

RGD: Arginina-lisina-aspártico

Vags: virulence activated genes

Vrgs: virulence repressed genes

c-di-GMP: diguanilato cíclico

DGC: Diguanilato ciclasa

PDE: Fosfodiesterasa

MOI: Multiplicidad de infección

AN: Ácido nicotínico

DO: Densidad óptica

ABS: Absorbancia

Str: Estreptomina

Gm: Gentamicina

Km: Kanamicina

pb: pares de bases

SFB: suero fetal bovino

sRNA: *small* RNA – RNA pequeño

ÍNDICE

Capítulo I: Introducción general	9
BORDETELLA.....	10
El género <i>Bordetella</i>	10
<i>Bordetellas</i> “clásicas”	11
Tos convulsa	12
Inmunoprevención	12
Factores de virulencia	13
Regulación de los factores de virulencia.....	17
Regulación de los genes de avirulencia.....	18
Mecanismos de patogénesis	20
SEÑALIZACIÓN POR C-DI-GMP	23
La molécula de c-di-GMP	24
Homeostasis de c-di-GMP	24
Síntesis de c-di-GMP: Diguanilato ciclasas	25
Degradación de c-di-GMP: Fosfodiesterasas	28
Proteínas “bifuncionales”	28
Rol de los dominios accesorios en la regulación de las DGC y PDE	29
Proteínas efectoras de c-di-GMP	33
Especificidad de la señalización por c-di-GMP.....	35
Regulación por c-di-GMP en <i>Bordetella</i>	37
Hipótesis y objetivos	41
Capítulo II: Análisis <i>in silico</i> de BP1492	42
Introducción	43
Predicción de la estructura de dominios y localización de BP1492	43
Dominio GGDEF.....	44
Dominio GAF	45
Modelado de la estructura de BP1492.....	46
Contexto genómico de <i>bp1492</i>	49
El gen <i>bp1492</i> se encuentra conservado en aislamientos clínicos de <i>B. pertussis</i>	49
Conclusiones y discusión.....	50
Capítulo III: Evaluación de la actividad DGC de BP1492	52
Introducción	53
Formación de <i>biofilm</i> en <i>Pseudomonas fluorescens</i> Δ 4DGC.....	53
Movilidad en <i>Escherichia coli</i> S17-1	54

Evaluación de la actividad DGC en <i>Bordetella</i>	55
Movilidad en <i>B. bronchiseptica</i>	56
Formación de <i>biofilm</i> en <i>B. bronchiseptica</i>	57
Formación de <i>biofilm</i> en <i>B. pertussis</i>	58
Regulación de la actividad DGC de BP1492.....	60
Construcción y evaluación de una variante de BP1492 constitutivamente activa	60
Evaluación de la regulación de la actividad de BP1492 por AMPc	63
Participación de BvgR en la regulación de la actividad de BP1492	64
Evaluación del rol de BvgR en la actividad DGC de BP1492	65
Conclusiones y discusión.....	66
Capítulo IV: Rol de BP1492 en la regulación de procesos asociados a c-di-GMP.....	70
Introducción	71
Formación de <i>biofilm in vitro</i>	71
Resistencia a estrés oxidativo	72
Resistencia a estrés ácido	74
Cinética de crecimiento a pH ácido.....	74
Supervivencia a estrés ácido	76
Ensayo de sobrevivencia en células eucariotas.....	77
Conclusiones y discusión.....	78
Capítulo V: Rol de una proteína de membrana en la regulación por c-di-GMP en <i>Bordetella</i>	81
Introducción	82
Comparación BP1092-BB2109	84
Búsqueda de posibles interactores de BP1092.....	85
Actividad DGC de BB4664	87
La actividad DGC de BB4664 es dependiente de BB2109	88
El dominio HK de BB2109 es requerido para la inhibición de la movilidad mediada por BB4664	89
Estudio del rol de dos posibles sitios de fosforilación en la interacción BB2109-BB4664.....	90
Conclusiones y discusión.....	92
Capítulo VI: Estudio proteómico de la interacción BP1092-BP0338 en <i>B. pertussis</i>	95
Introducción	96
Construcción de las cepas	96
Obtención de proteínas totales	97
Proteómica comparativa BPSM vs BPSM <i>bp1092</i>	97
Identificación de las proteínas expresadas diferencialmente en la cepa mutante en <i>bp1092</i> en condición de c-di-GMP basal.....	97

Identificación de las proteínas expresadas diferencialmente en la cepa mutante en <i>bp1092</i> con alto c-di-GMP.....	99
Búsqueda de proteínas reguladas por el par BP1092-BP0338.....	102
Proteínas asociadas a la virulencia reguladas por el par BP1092-BP0338.....	103
Conclusiones y discusión.....	105
Capítulo VII: Conclusiones generales y discusión	108
Capítulo VIII: Materiales y métodos.....	117
Organismos utilizados	118
<i>Escherichia coli</i>	118
<i>Bordetella pertussis</i>	118
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	118
<i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	119
Cepas y antibióticos	119
Técnicas de biología molecular	119
Preparación de ADN plasmídico (miniprep).....	119
Cuantificación de ADN.....	120
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	120
Electroforesis en gel de agarosa	121
Secuenciación de ADN.....	121
Digestión por enzimas de restricción	121
Ligaciones	121
Células electrocompetentes de <i>E. coli</i> y electroporación	122
Clonación por recombinación <i>in vivo</i> en levaduras	122
Conjugación en <i>Bordetella</i>	123
Obtención de mutantes en <i>B. bronchiseptica</i>	124
Obtención de mutantes en <i>B. pertussis</i>	125
Ensayo de supervivencia a estrés oxidativo.....	125
Ensayo de supervivencia a estrés ácido	126
Curvas de crecimiento.....	126
Ensayos de formación de <i>biofilm</i>	126
<i>B. bronchiseptica</i>	127
<i>B. pertussis</i>	127
<i>P. fluorescens</i>	127
Tinción con cristal violeta.....	128
Ensayos de movilidad.....	128
<i>E. coli</i>	128

<i>B. bronchiseptica</i>	128
Ensayos de infección en células A549	129
Proteómica comparativa	129
ANEXO I: Medios de cultivo y soluciones utilizadas.....	132
ANEXO II: Plásmidos utilizados.....	136
ANEXO III: Primers utilizados	137
ANEXO IV: Proteínas identificadas	139
Bibliografía.....	187

Capítulo I: Introducción general

BORDETELLA

El género *Bordetella*

El género *Bordetella* está compuesto por cocobacilos Gram-negativos y forma parte del filo Proteobacteria. Dentro de este género se encuentran bacterias de gran relevancia médica, ya que son capaces de infectar el tracto respiratorio de humanos con distintas consecuencias según la especie que produce la infección. De la misma manera, también se encuentran dentro de este género microorganismos capaces de infectar el epitelio respiratorio en otros mamíferos, lo que hace importante su estudio en el campo de la medicina veterinaria¹. En los últimos años se ha ido incrementado el número de especies pertenecientes a este género, incluyendo algunas aisladas del ambiente².

En la siguiente tabla se listan las especies que componen el género *Bordetella* actualmente:

Espece	Hospedador Fuente de aislamiento	Genoma	Primer aislamiento
<i>Bordetella ansorpii</i>	Exudado de un quiste epidérmico	6,2 Mb	3
<i>Bordetella avium</i>	Aves	3,73 Mb	4
<i>Bordetella bronchialis</i>	Paciente fibroquístico	5,9 Mb	5
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Amplio rango de mamíferos	5,2 Mb	6
<i>Bordetella flabilis</i>	Paciente fibroquístico	5,95 Mb	5
<i>Bordetella hinzii</i>	Aves de corral y humanos	4,89 Mb	7
<i>Bordetella holmesii</i>	Humanos	3,6 Mb	8
<i>Bordetella parapertussis</i>	Humanos y ovejas	4,77 Mb	9
<i>Bordetella pertussis</i>	Humanos	4,1 Mb	10
<i>Bordetella pseudohinzii</i>	Ratones	4,53 Mb	11
<i>Bordetella sputigena</i>	Paciente fibroquístico	-	5
<i>Bordetella atropi</i>	Nematodos	-	12
<i>Bordetella trematum</i>	Heridas infectadas	4,44 Mb	13
<i>Bordetella muralis</i>	Ambiental	-	14
<i>Bordetella petri</i>	Ambiental	4,99 Mb	15
<i>Bordetella tumbae</i>	Ambiental	-	14
<i>Bordetella tumulicola</i>	Ambiental	-	14

Fuente: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi> (2/11/2020).

Bordetellas “clásicas”

Tres de las especies pertenecientes al género *Bordetella* forman parte de un grupo conocido como “*Bordetellas* clásicas”: *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*. Esta clasificación posee sus raíces, en parte, a una cuestión histórica, dado que fueron descritas hace alrededor de un siglo y durante muchos años fueron las únicas integrantes del género. Por otra parte, representan las especies más relevantes debido a que son responsables de casi la totalidad de las infecciones reportadas en seres humanos y animales, lo que hace importante su estudio desde el punto de vista de la medicina y la veterinaria.

Las especies que componen el grupo de las *Bordetellas* clásicas se encuentran estrechamente relacionadas. Por un lado, comparten la mayoría de los factores de virulencia caracterizados en el género, así como también la regulación de la expresión de estos factores por parte del sistema de dos componentes BvgAS¹⁶. Por otro lado, comparando los genomas de las cepas de referencia *B. pertussis* Tohama I, *B. bronchiseptica* RB50 y *B. parapertussis* 12822 se puede comprobar que presentan una gran similitud a nivel genómico, compartiendo alrededor de 3000 genes. *B. bronchiseptica* RB50 es la que posee el genoma de mayor tamaño, con 5,4 Mb mientras que *B. pertussis* Tohama I y *B. parapertussis* 12822 poseen genomas más pequeños, con 4,1 Mb y 4,7 Mb, respectivamente. Diversos trabajos han propuesto y demostrado que la evolución de las tres *Bordetellas* clásicas se habría dado a partir de un ancestro similar a *B. bronchiseptica*, principalmente por eventos de pérdida de material genético e inactivación génica^{11,17}.

La reducción del tamaño del genoma por la pérdida de material genético ha sido propuesto como uno de los principales mecanismos responsables de la variación del rango de hospedador entre estas especies¹⁸. *B. bronchiseptica* presenta un rango de hospedador muy amplio, pudiendo infectar diversos tipos de animales como perros, cerdos, conejos, humanos e incluso amebas¹⁹. *B. parapertussis* es capaz de infectar tanto a humanos como a ovejas y a partir de análisis filogenéticos se pudo demostrar que ambos linajes evolucionaron de forma independiente a partir de un ancestro común²⁰. Por su parte, *B. pertussis* tiene como único huésped conocido al ser humano. Como consecuencia de la dinámica evolutiva descrita, no es común encontrar genes en el genoma de *B. pertussis* que no presenten su respectivo homólogo en *B. bronchiseptica*. Es por este motivo que los genes exclusivos de *B. pertussis* resultan particularmente interesantes de estudiar, debido a que es altamente probable que si fueron incorporados por esta especie se deba a que contribuyeron a algún mecanismo importante para la adaptación del patógeno al hospedador humano.

Tos convulsa

B. pertussis es el agente causal de una enfermedad altamente contagiosa y con altos niveles de morbilidad y mortalidad conocida como “tos convulsa o coqueluche”. La misma se transmite por gotas expulsadas por un individuo infectado, siendo capaz de contagiar prácticamente al 100% de los contactos domésticos no inmunizados²¹. El cuadro clínico típico en individuos no inmunizados se divide en cuatro estadios: I) unos pocos días sin síntomas luego del contacto con un individuo infectado; II) “fase catarral” con rinorrea de aproximadamente una semana de duración; III) “fase paroxística” de varias semanas, donde el paciente presenta una tos característica seguida por silbidos (*whoops*, lo que da el nombre de *whooping cough* a la enfermedad) y IV) varias semanas de tos menos severa, conocida como la “fase de convalecencia”. La complicación más común de esta enfermedad es la neumonía, que puede derivar en un cuadro clínico grave e incluso terminar en la muerte del paciente.

Antes de la introducción de las primeras vacunas, la tos convulsa era considerada una enfermedad exclusiva de niños, ya que era en este rango etario donde se observaba el mayor número de contagios, complicaciones y mortalidad. Sin embargo, con el paso de los años y la profundización de los estudios epidemiológicos se pudo demostrar que los adultos también pueden ser portadores del patógeno e incluso desarrollar una enfermedad. La principal característica de los adultos infectados es, sin embargo, que pueden ser vehículos de transmisión del patógeno hacia infantes no vacunados, que es la población de mayor riesgo y presenta los niveles más elevados de morbilidad y mortalidad²².

Inmunoprevención

Los inicios de la vacunación contra *B. pertussis* se remontan a la década de 1940. Las primeras vacunas utilizadas masivamente estaban diseñadas a partir de bacterias inactivadas químicamente y fueron formuladas en conjunto con las vacunas contra el tétanos y la difteria en lo que se conoce como vacuna DTP. La aplicación masiva de esta vacuna disminuyó drásticamente la incidencia, morbilidad y mortalidad de la enfermedad¹.

El éxito de la vacuna a célula entera en la prevención de la enfermedad estaba claro, pero en los años subsiguientes comenzaron a surgir preocupaciones en torno a los efectos secundarios que se presentaban en algunos de los individuos vacunados siendo los más comunes fiebre, enrojecimiento e hinchazón de extremidades y convulsiones²³. Esto llevó al surgimiento de una fuerte presión por parte de la opinión pública contra la

aplicación de la vacuna, lo que derivó en la suspensión de su aplicación en muchos países. Esta situación dejó expuesta claramente la necesidad de generar nuevas vacunas, que fueran capaces de prevenir la enfermedad, pero sin los efectos secundarios de la vacuna a célula entera.

La siguiente generación de vacunas destinadas a prevenir la tos convulsa se basó en el diseño de formulaciones compuestas de antígenos de *B. pertussis* purificados con capacidad inmunogénica comprobada, como la toxina pertussis (PTX), hemaglutinina filamentosa (FHA), pertactina (PRN) y fimbrias²⁴. La primera vacuna acelular fue introducida en Japón a principios de la década de 1980 y consistía principalmente de PTX y FHA detoxificadas, con base en años de investigación que demostraban que con esa combinación de antígenos se observaban niveles de protección similares a los correspondientes a la vacuna celular. Esta vacuna fue muy bien recibida por la opinión pública debido a que disminuyó drásticamente los reportes de efectos secundarios que aparecían tras la vacunación, lo que había constituido una de las principales críticas a la vacuna celular²⁵.

A principios de la década del 90 fue introducida en E.E.U.U. la primera vacuna acelular, formulada a partir de factores proteicos de *B. pertussis* purificados. En los años posteriores se extendió la aplicación de este tipo de vacunas en la mayoría de los países desarrollados. A pesar de la minimización de los efectos secundarios y de los indicios iniciales positivos, con el correr de los años se fue evidenciando que la inmunidad conferida por esta vacuna no era tan efectiva como la conferida por la vacuna celular. El número de casos de tos convulsa ha ido aumentando consistentemente en los últimos años, por lo que se continúan investigando intensamente distintas estrategias con el objetivo de mejorar las vacunas existentes²⁴.

Factores de virulencia

Para llevar a cabo eficientemente la colonización del tracto respiratorio y así producir la infección, *B. pertussis* expresa una serie de factores de virulencia que han sido clasificados en dos grandes grupos: toxinas y adhesinas. Las toxinas incluyen: toxina pertussis (PTX), citotoxina traqueal (TCT), adenilato ciclasa (ACT) y lipooligosacárido (LOS). Por su parte, dentro de las adhesinas se encuentran la hemaglutinina filamentosa (FHA), pertactina (PRN) y fimbria (Fim). La mayoría de estos factores de virulencia han sido incluidos en las formulaciones de vacunas acelulares o de componentes²⁶.

Toxina pertussis (PTX)

Esta toxina constituida por cinco subunidades es el principal factor de virulencia de *B. pertussis* y su expresión es exclusiva de esta especie. Es una toxina de tipo AB, donde A es el protómero catalíticamente activo y B es el oligómero responsable de la unión a las células del hospedador.

Se ha demostrado su importancia en la colonización, modulación de la respuesta inmune e inducción de leucocitosis, entre otros²⁷. La mayoría de los efectos de PTX dependen de su actividad catalítica ADP-ribosilasa efectuada una vez trasladada al interior de la célula hospedadora, que interfiere en la señalización por proteínas G. Sin embargo, recientemente se ha reportado que la toxina afecta la migración de células dendríticas, proceso clave en el montaje de la respuesta inmune adaptativa, a través de su oligómero B y de forma independiente de la actividad catalítica, demostrando que el rol de la toxina en la infección no se limita a su acción enzimática²⁸.

Citotoxina traqueal (TCT)

Esta toxina corresponde a un monómero de peptidoglicano que se produce durante el recambio del mismo que todas las bacterias Gram negativas llevan adelante durante el crecimiento. La mayoría de las bacterias reciclan este monómero a través de una proteína de membrana llamada AmpG. *B. pertussis*, al carecer de esta proteína, libera este monómero al medio. Estudios en el modelo murino demostraron que TCT induce la producción de óxido nítrico (NO) el cual produce un efecto dañino en las células ciliadas del epitelio respiratorio²⁹.

Toxina adenilato ciclasa (ACT)

Esta toxina bifuncional consta de un polipéptido de 200 kDa secretado por un sistema de secreción tipo I y posee dos actividades catalíticas: adenilato ciclasa y hemolisina. El dominio N-terminal es responsable de la actividad adenilato ciclasa, mientras que el dominio C-terminal es responsable de la actividad hemolisina y la traslocación al interior de células eucariotas³⁰.

La toxina es secretada en forma inactiva y luego activada por acilación, modificación crucial para la internalización del dominio N-terminal de la proteína en las células del sistema inmune³¹. Luego de la traslocación a la célula eucariota, la actividad adenilato ciclasa se activa a través de la unión de la proteína a calmodulina, generando un aumento de los niveles de AMPc en la célula hospedadora a expensas del consumo de ATP. Se cree que esta depleción de ATP es la responsable de la inducción de la muerte celular y lisis observada en macrófagos³². Por otro lado, el dominio C-terminal de la

proteína tiene la capacidad de generar poros en la membrana plasmática de células eucariotas, lo que contribuye a la actividad citotóxica de la misma³³.

A partir de estudios genéticos se ha demostrado que la toxina tiene un rol en la colonización del epitelio respiratorio en etapas tardías de la infección, lo que sugiere que podría ser importante para la persistencia del patógeno³⁴. Por otra parte, la toxina también afecta la respuesta inmune del hospedador inhibiendo la actividad proinflamatoria y bactericida de las células fagocíticas²⁶.

Hemaglutinina Filamentosa (FHA)

Esta proteína de 220 kDa es la adhesina principal de *B. pertussis* y es importante para la unión a células eucariotas y a estructuras extracelulares en el epitelio respiratorio. Inicialmente se produce en una forma inactiva que luego sufre procesos de maduración en ambos extremos previo a su secreción al exterior de la célula³⁵. Se ha demostrado su rol en la formación de *biofilm* tanto *in vitro* como en el tracto respiratorio en el modelo murino, lo que sugiere que podría ser importante en la persistencia del patógeno en ese nicho³⁶.

Además de su rol como adhesina, se ha propuesto que FHA podría afectar la respuesta inmune del hospedador en infecciones por bacterias del género *Bordetella*. Se ha demostrado que la proteína FHA de *B. bronchiseptica* presenta propiedades inmunomodulatorias que permiten el establecimiento y persistencia del patógeno en el modelo murino. Estas propiedades, sin embargo, no fueron observadas para la proteína FHA de *B. pertussis*, lo que podría sugerir que el impacto de esta proteína en el control de la respuesta inmune podría variar de especie a especie. Dado que el ratón no es un hospedador natural de *B. pertussis*, no se puede descartar que FHA no presente efectos inmunomodulatorios en ese modelo, pero sí lo haga en el contexto de la infección en humanos³⁷.

Pertactina (PRN)

Es una proteína de 69 kDa que se expresa en la superficie celular. Se ha propuesto que podría tener un rol en la unión a células eucariotas, debido a la presencia de regiones ricas en prolina, repeticiones ricas en leucina y el tripéptido RGD (Arg-Gly-Asp), características estructurales asociadas a este tipo de interacción³⁸. En *B. bronchiseptica*, se demostró que esta proteína está involucrada en la resistencia del patógeno a la eliminación por neutrófilos³⁹. En *B. pertussis*, estudios en cultivos celulares de células dendríticas sugieren que la presencia de pertactina inhibiría el proceso de adherencia y/o internalización de la bacteria a la célula eucariota, aportando de esta manera a evitar la eliminación del patógeno por parte de la célula del hospedador⁴⁰.

A pesar de que el rol de este factor de virulencia en la infección en humanos por *B. pertussis* aún no está claro, en los últimos años se ha reportado un incremento en la circulación de cepas de *B. pertussis* que carecen de PRN en países con esquemas de vacunación basados en la vacuna acelular o a componentes. Por motivos que aún se desconocen, se cree que la eliminación de PRN conferiría a la bacteria una ventaja adaptativa en individuos que han recibido ese tipo de vacunas⁴¹. Sin embargo, en países con esquemas de vacunación basados en vacunas a célula entera, la detección de este tipo de aislamientos es muy rara, por lo que se cree que el aumento en la prevalencia de las cepas deficientes en PRN es consecuencia de la presión de selección ejercida exclusivamente por la vacuna acelular^{42,43}.

Fimbria

Las fimbrias son unas proteínas filamentosas que expresan la mayoría de las bacterias en su superficie celular y cumplen la función de adhesión a sustratos. *B. pertussis* expresa dos fimbrias serológicamente distintas llamadas Fim2 y Fim3. Estas proteínas constituyen uno de los componentes comúnmente incluidos en la formulación de vacunas acelulares. Se ha demostrado que la presencia de anticuerpos anti-fimbria en individuos vacunados se correlaciona con la protección frente al contagio⁴⁴.

Estudios realizados en *B. bronchiseptica* han demostrado la importancia de esta proteína en la colonización y la persistencia en un modelo de infección en ratas⁴⁵. En cuanto a su impacto en la respuesta inmune, se demostró que la fimbria posee propiedades inmunomodulatorias, dado que un mutante en esta proteína presentó una mayor inducción de citoquinas pro-inflamatorias⁴⁶. En un trabajo publicado recientemente se demostró que una cepa de *B. pertussis* carente de fimbrias presenta un defecto en la colonización de la nariz en un modelo animal, lo que podría relacionar a esta proteína con el establecimiento en ese nicho y podría indicar un posible rol en la transmisión del patógeno⁴⁷.

Lipooligosacárido (LOS)

Esta endotoxina producida por *B. pertussis* difiere del lipopolisacárido clásico en que carece de la porción polisacáridica distal conocida como antígeno O. En su lugar, esta bacteria expresa una molécula que consta solo del oligosacárido núcleo y el lípido A⁴⁸. A pesar de no ser un componente secretado, el LOS puede ser liberado al medio luego de la muerte bacteriana o durante la división celular y participar de la interacción con las células del huésped. Mediante un estudio de mutagénesis diseñado para evaluar la esencialidad de genes de *B. pertussis* en el contexto de la infección en el modelo murino,

se identificaron varios genes relacionados a la biosíntesis del LOS y se demostró la importancia de este factor de virulencia *in vivo*⁴⁹.

El LPS bacteriano es uno de los principales patrones moleculares reconocidos por el sistema inmune a través de los receptores tipo *toll* (TLRs). En un estudio comparativo realizado en cultivos de células dendríticas humanas se observaron diferencias en la respuesta inducida por el LPS de *B. parapertussis* y el LOS de *B. pertussis*, lo que podría contribuir en parte a la diferencia en la patogenicidad de estas cepas en la infección en humanos⁵⁰.

Regulación de los factores de virulencia

Sistema BvgAS

B. pertussis controla la expresión de sus factores de virulencia principalmente a través del sistema de dos componentes BvgAS, en el cual BvgS es el sensor transmembrana y BvgA es el regulador de respuesta con capacidad de unirse al ADN y activar la transcripción de los genes de virulencia⁵¹. A pesar de que aún se desconoce la identidad de la señal sensada por la histidina quinasa de membrana, se sabe que el sistema se encuentra activo en las condiciones estándar de cultivo de la bacteria a 37°C, condición en la cual es mayor la proporción de BvgA fosforilada y la transcripción de los factores de virulencia se encuentra activada. La actividad de este sistema puede inhibirse modificando las condiciones de cultivo, ya sea utilizando una temperatura de 25°C o con el agregado de moduladores como ácido nicotínico (AN) o sulfato de magnesio. En esas condiciones, se inhibe la transferencia de fosfatos hacia el regulador de respuesta, impidiendo la activación de la transcripción de los factores de virulencia⁵².

Según el estado de activación del sistema BvgAS se han definido tres fases fenotípicas de la bacteria: la fase Bvg⁺ o virulenta, la fase Bvg⁻ o avirulenta y la fase Bvgⁱ o intermedia. En la fase virulenta, el sistema BvgAS se encuentra activo y se expresan la mayoría de los factores de virulencia mencionados en la sección anterior: FHA, PRN, Fim2/Fim3, PTX y ACT, los cuales se denominan *vags* (*virulence-activated genes*). Cuando el sistema se encuentra inactivo, dejan de expresarse dichos factores y se produce un aumento en la expresión de otro grupo de genes conocido como *vrgs* (*virulence-repressed genes*) cuya función en la patogénesis de la bacteria aún no es clara. Entre estos genes se puede mencionar aquellos que codifican para la biosíntesis de la cápsula y una variedad de genes involucrados en distintas vías metabólicas⁵³. Por último, en la fase intermedia dejan de expresarse algunos de los factores de virulencia, se mantiene la expresión de otros y además se induce la expresión de una proteína

específica de esta fase llamada BipA, la cual se cree que podría funcionar como adhesina⁵¹.

A pesar de existir una caracterización detallada *in vitro* del funcionamiento del sistema BvgAS, el rol de cada una de las fases de virulencia en el proceso de infección de *B. pertussis* aún no se conoce por completo. En un principio se proponía que la fase Bvg⁺, en la cual se expresan los factores de virulencia descritos en la sección anterior, era la única relevante para el proceso de infección. Esta idea derivaba de estudios *in vivo* en modelos animales con cepas mutantes de *B. pertussis* bloqueadas en las distintas fases de virulencia. En dichos estudios se observó que cepas bloqueadas en fase Bvg⁺ presentaban idéntica capacidad de colonización del tracto respiratorio con respecto a la cepa salvaje, mientras que cepas bloqueadas en fase Bvg⁻ eran rápidamente eliminadas^{54,55}. Sin embargo, esta concepción ha sido discutida en los últimos años por la aparición de evidencias que demuestran que *B. pertussis* expresa *in vivo* genes de fase avirulenta, como el flagelo, y la acumulación de clones Bvg⁻ en un modelo experimental de infección a largo plazo en ratones^{56,57}. Adicionalmente, un estudio transcriptómico apuntado a caracterizar la adaptación de *B. pertussis* a la vida intracelular dentro de macrófagos, demostró que en esas condiciones se reprime la transcripción de los factores de virulencia a la vez que aumenta la transcripción de genes de avirulencia. Debido a que se ha propuesto que la infección por *B. pertussis* podría incluir un estadio intracelular, estos resultados proveen una hipótesis concreta del rol que podría estar cumpliendo la fase Bvg⁻ en la patogénesis de esta bacteria⁵⁸.

Regulación de los genes de avirulencia

A diferencia de la regulación de los genes de virulencia, cuyos mecanismos regulatorios han sido estudiados en profundidad, la regulación de los genes de avirulencia y su rol en la infección todavía representan una incógnita importante en el entendimiento de la variación fenotípica de *B. pertussis*. A partir de estudios genéticos se ha podido asociar la regulación de dichos genes a la actividad de dos proteínas: BvgR, como un regulador negativo en la fase virulenta, y RisA, como un regulador positivo en la fase de avirulencia⁵⁹.

BvgR

BvgR es una proteína citoplasmática de 32 kDa codificada por un gen que se encuentra inmediatamente *downstream* a los genes *bvgA* y *bvgS* y cuya expresión es regulada por la unión de BvgA a su promotor, por lo que se trata de un *vag*⁶⁰. Fue identificada por primera vez a través de un ensayo de mutagénesis por transposones, en el cual se

observó que inserciones en una región adyacente a BvgAS tenían como consecuencia la activación de genes que deberían encontrarse reprimidos en las condiciones de cultivo utilizadas. Esto llevó a la descripción de una proteína cuyo rol es reprimir los genes de avirulencia en la fase virulenta de la bacteria, sumando de esta manera un tercer componente a este sistema regulatorio⁶¹. Estudios posteriores utilizando técnicas transcriptómicas confirmaron el rol de esta proteína como regulador negativo de genes *vrgs*, al observarse una mayor expresión de los mismos en una cepa mutante en BvgR⁶². El mecanismo por el cual BvgR lleva a cabo la represión de los factores de virulencia no se conoce. El análisis de la secuencia aminoacídica de la proteína indica la presencia de un dominio EAL, comúnmente asociado a la actividad fosfodiesterasa que cataliza la degradación del segundo mensajero diguanilato cíclico (c-di-GMP). Por lo tanto, se ha propuesto que esta proteína podría ejercer su función represora a partir de disminuir los niveles de dicha molécula en la célula⁶³. Sin embargo, dado que dicha hipótesis no ha sido demostrada experimentalmente y que el dominio EAL de BvgR no posee el motivo catalítico conservado implicado en la degradación de c-di-GMP, es probable que esta proteína lleve a cabo su función a través de otro mecanismo. El rol de esta familia de proteínas y de c-di-GMP en la regulación de distintos procesos celulares se describirá más adelante.

Sistema RisAS

Este sistema de dos componentes fue originalmente descrito en *B. bronchiseptica* como importante para la resistencia al estrés oxidativo, la expresión de genes de avirulencia y la persistencia en el tracto respiratorio de ratones⁶⁴. En ese patógeno el sistema consta de dos proteínas, el sensor histidina quinasa RisS y el regulador de respuesta citoplasmático RisA, por lo que se denomina sistema RisAS.

Por su parte, en *B. pertussis* también se ha demostrado el rol de RisA en la regulación de la expresión de genes de avirulencia. Mediante análisis de la secuencia de *risS* se pudo identificar la presencia de una mutación en el gen, lo que hace que esta bacteria exprese una variante truncada de esta proteína⁶⁵. Posteriormente se pudo identificar que la proteína sensora para este sistema de dos componentes es codificada por un gen exclusivo de *B. pertussis* que expresa una proteína denominada RisK, la cual a través de su actividad histidina quinasa es capaz de fosforilar a RisA y así permitir la regulación de la expresión génica⁶³.

Mediante ensayos de transcriptómica se ha logrado describir parcialmente el impacto de la regulación por este sistema de dos componentes en la expresión génica de *B. pertussis*. La mayoría de los genes activados por RisA corresponden a *vrgs* previamente descritos, para los cuales se observó que era importante la fosforilación de la proteína

por la quinasa Risk. Además, se encontró que RisA reprime la expresión de ciertos *vags* de forma independiente de la fosforilación⁶².

Mecanismos de patogénesis

Unos de los objetivos principales que se persiguen en el estudio de la patogénesis de *B. pertussis* es describir los mecanismos por los cuales este patógeno es capaz de colonizar el epitelio respiratorio del huésped y llevar a cabo la infección. Estos estudios se han revitalizado en los últimos años debido a la necesidad de encontrar respuestas ante la resurgencia de la enfermedad pese a los programas de vacunación vigentes en todo el mundo. A continuación, se describen algunos de los mecanismos conocidos más relevantes.

Modulación de las defensas del huésped

La respuesta inmune frente a la infección por *B. pertussis* comienza con la inducción de la respuesta inmune innata, mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados al patógeno por células epiteliales y del sistema inmune presentes en el tracto respiratorio. Esta señal culmina en la activación de la actividad de macrófagos y neutrófilos, que buscarán eliminar a la bacteria a través de su fagocitosis y posterior destrucción. Por otra parte, con el reconocimiento de ligandos a través de receptores de superficie, se induce la maduración de las células dendríticas. Estas células maduras son capaces de migrar al tejido linfático y al bazo, donde presentan el antígeno bacteriano a células T, iniciando de esta manera la respuesta inmune adaptativa mediada por anticuerpos⁶⁶.

B. pertussis es capaz de utilizar sus factores de virulencia para interferir de diversas maneras en la respuesta inmune del huésped. Se han descrito una gran variedad de ejemplos de mecanismos de inmunomodulación, sobre todo asociados a las actividades de la toxina pertussis, ACT y FHA⁶⁷.

Supervivencia en células eucariotas

A pesar de tratarse de un patógeno históricamente considerado como extracelular, en los últimos años se ha reportado en varios trabajos la capacidad de *B. pertussis* de invadir y sobrevivir en distintos tipos celulares eucariotas, como células epiteliales, macrófagos y neutrófilos^{68,69,70,71}. Un estudio reciente demostró que esta habilidad se encuentra conservada entre las especies del género *Bordetella* que son capaces de generar infecciones en mamíferos, pero no en especies que solo han sido aisladas a partir de fuentes ambientales, lo que sugiere que esta característica pudo haber sido

importante en la adaptación de las especies patógenas a sus distintos huéspedes⁷². Este mecanismo ha sido propuesto como una posible estrategia del patógeno para evadir la respuesta inmune del huésped y conformar un reservorio que luego podría servir para la diseminación a otros tejidos y/o la transmisión a otros huéspedes⁷³.

La capacidad de las bacterias del género *Bordetella* de invadir células epiteliales se describió por primera vez en *B. bronchiseptica*, cuando se estudió su interacción con células A549 en cultivo, una línea celular de carcinoma de pulmón que es útil como modelo de epitelio respiratorio⁷⁴. En los años subsiguientes, ensayos similares utilizando otra línea celular de epitelio respiratorio (Células HTE), evidenciaron que *B. pertussis* es capaz de invadir y persistir al menos 24 horas en esta línea celular^{68,75}. Además, *B. pertussis* fue encontrada dentro de las células ciliadas del epitelio respiratorio en niños con neumonía⁷⁶. Posteriormente, se demostró la capacidad de *B. pertussis* de invadir y sobrevivir intracelularmente en células A549. En cuanto al mecanismo de resistencia una vez en el interior de la célula epitelial, se observó que la bacteria fue capaz de evadir la fusión lisosomal y su consecuente eliminación, lo que permitió recuperar bacterias viables del interior celular hasta 48 horas luego de la infección⁷¹.

Una observación interesante proviene de ensayos de infección realizados tanto con células A549 como con macrófagos, donde se demuestra que una pequeña porción de bacterias resistentes a la eliminación luego de ser fagocitadas, pueden volver a repoblar el medio extracelular^{71,58}. Esto sugiere que las bacterias capaces de sobrevivir en estos tipos celulares podrían contribuir a la colonización de otros nichos dentro del hospedador o la transmisión de la enfermedad a otros hospedadores.

Formación de *biofilm*

La formación de *biofilm* ha sido propuesta como una posible estrategia de patogénesis llevada a cabo por *B. pertussis* en el huésped para lograr persistir a largo plazo en el mismo y evitar la acción de los distintos componentes del sistema inmune. Esta hipótesis se basa en lo observado para otros patógenos, donde la formación de estas estructuras durante la infección confiere una elevada resistencia a los antimicrobianos y a la acción del sistema inmune del huésped^{77,78}. Un *biofilm* es una comunidad microbiana sésil, formada por células adheridas a un sustrato o interfase y entre sí, que se encuentran embebidas en una matriz polimérica producidas por ellas mismas y que presentan un fenotipo propio⁷⁹.

En los últimos años, se ha descrito la capacidad de *B. pertussis* de formar *biofilms in vitro* en distintas superficies y en distintos diseños experimentales en el laboratorio^{80,81}. Por otro lado, también existen reportes de formación de *biofilm* en superficies bióticas, tales como la nariz y tráquea recuperadas de ratones infectados^{36,82}.

En dos trabajos publicados casi simultáneamente, se reportó que el sistema BvgAS regula la formación de *biofilm* en el género *Bordetella*^{83,84}. Como se describió en un apartado anterior, este sistema de dos componentes regula la expresión de los factores de virulencia de *Bordetella*, entre los que se encuentran varias adhesinas importantes para la formación de *biofilm*. Uno de estos estudios demuestra que la condición de fase de virulencia intermedia (Bvg^I) es la que induce una mayor formación *biofilm* en *B. bronchiseptica*, observación que ha sido corroborada por nuestro laboratorio⁸⁵.

En un ensayo de proteómica comparativa entre los estados planctónico y sésil de *B. pertussis*, Serra y colaboradores identificaron que en la condición de *biofilm* se encontraba aumentada la expresión de una gran variedad de adhesinas y proteínas de respuesta a estrés, así como también proteínas relacionadas a la síntesis de polisacáridos⁸⁶. Adicionalmente, se han publicado trabajos que describen la importancia de las adhesinas en el proceso de formación de *biofilm* de *B. pertussis*. Una de ellas es FHA, uno de los principales factores de virulencia, cuya delección provoca una disminución de la capacidad de formar *biofilm* tanto *in vitro* como *in vivo*³⁶. Otra adhesina importante es el polisacárido Bps, codificado por el locus *bpsABCD*. Una cepa de *B. pertussis* que no expresa este polisacárido fue incapaz de formar *biofilms* maduros *in vitro* y presentó una disminución en su capacidad de colonizar la nariz y tráquea de ratones en comparación con la cepa salvaje⁸².

La formación de *biofilm* en el contexto de la infección en humanos y su posible rol en la colonización y persistencia del patógeno aún se encuentra sujeto a discusión. Las evidencias que apuntan en ese sentido provienen sobre todo de observaciones histopatológicas de tejidos de pacientes infectados. En los mismos pueden observarse cúmulos de bacterias que podrían representar un *biofilm*, pero que no han sido definidos de tal manera debido a la falta de evidencia específica que permita asegurar que se trata de este tipo de estructuras^{76,87}. Además, el análisis de sueros de pacientes infectados con *B. pertussis* arrojó como resultado la presencia de anticuerpos específicos anti-Bps, lo que sugiere que el mismo podría ser expresado dentro del huésped e indicaría que en algún momento durante el transcurso de la enfermedad *B. pertussis* pudo haberse encontrado formando *biofilm*⁸². Por último, en un trabajo con aislamientos clínicos circulantes de *B. pertussis*, se pudo establecer una relación entre mayor formación de *biofilm in vitro* y mayor colonización en el modelo murino. Los autores proponen que estos aislamientos con gran capacidad de formar *biofilm* presentarían una mayor capacidad de colonizar el epitelio respiratorio humano debido a una mayor resistencia a los mecanismos de la respuesta inmune del huésped⁸⁸.

Nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en los últimos años al estudio de la formación de *biofilm* en *Bordetella* spp., con el objetivo principal de describir los mecanismos

moleculares involucrados en su regulación. En este contexto, surgió como uno de los actores principales de esta regulación el sistema de señalización por c-di-GMP. A partir de allí hemos avanzado en la descripción de los mecanismos por los cuales este segundo mensajero regula la formación de *biofilm*, pero también hemos evidenciado su rol en la regulación de otros procesos celulares importantes para la patogénesis de *B. bronchiseptica*, como la sobrevivencia en células eucariotas y la expresión del sistema de secreción tipo III (SST3)⁸⁹⁻⁹¹. En las secciones subsiguientes se describen aspectos generales de la señalización por c-di-GMP, su relevancia en el control de distintos procesos celulares en bacterias y, particularmente, su importancia como mecanismo de señalización en bacterias del género *Bordetella*.

SEÑALIZACIÓN POR C-DI-GMP

Uno de los sistemas utilizados por las bacterias para responder a señales tanto del entorno como intracelulares es el mediado por el segundo mensajero c-di-GMP (3'-5' diguanilato cíclico). Esta molécula fue identificada por primera vez en el año 1987 por Benziman y colaboradores como un factor alostérico requerido para la activación de la biosíntesis de celulosa en la alfa proteobacteria *Gluconacetobacter xylinum*⁹². Poco tiempo después, se demostró que la síntesis de celulosa en *Agrobacterium tumefaciens* también era dependiente de c-di-GMP, lo que contribuyó a generar la idea de que este sistema regulatorio podría encontrarse distribuido en distintos géneros y filos bacterianos⁹³. En los años subsiguientes se pudo identificar a las familias de proteínas responsables de la síntesis y degradación de c-di-GMP, lo que permitió la búsqueda de estas proteínas por métodos bioinformáticos en los genomas bacterianos publicados. A partir de ese momento comenzó a quedar claro que la transducción de señales por este segundo mensajero era un mecanismo ampliamente extendido en bacterias⁹⁴. Con el paso de los años y la profundización de las investigaciones en distintos géneros bacterianos quedó en evidencia que la regulación de la biosíntesis de celulosa no era el único fenotipo dependiente de los niveles intracelulares de c-di-GMP. Al día de hoy se ha podido demostrar que esta molécula participa en la regulación de una gran variedad de procesos, entre los que se pueden mencionar el control del ciclo celular, producción de exopolisacárido, tolerancia a antibióticos, *quorum sensing*, virulencia, quimiotaxis, resistencia a distintos tipos de estrés ambiental y la transición entre vida planctónica y formación de *biofilm*^{95,96}.

La molécula de c-di-GMP

El c-di-GMP es un dinucleótido de guanina que se forma a partir de la unión entre los átomos 3' y 5' de los ribonucleótidos que lo componen a través de enlaces fosfodiéster. Su estructura química fue determinada por primera vez por cristalografía en 1990 (Figura 1.1.a)⁹⁷. Estudios posteriores determinaron que la molécula puede encontrarse en estado monomérico o dimérico (Figura 1.1.b y 1.1.c, respectivamente), dependiendo de la proteína con la que se copurifica. La forma monomérica se encuentra comúnmente asociada a estructuras cristalinas de proteínas con dominio EAL^{98,99}, mientras que la forma dimérica se ha encontrado asociada a sitios de regulación alostérica y proteínas efectoras que unen c-di-GMP¹⁰⁰. Incluso se ha descrito la capacidad de c-di-GMP de formar tetrámeros y octámeros, aunque se desconoce si esta propiedad posee relevancia biológica¹⁰¹.

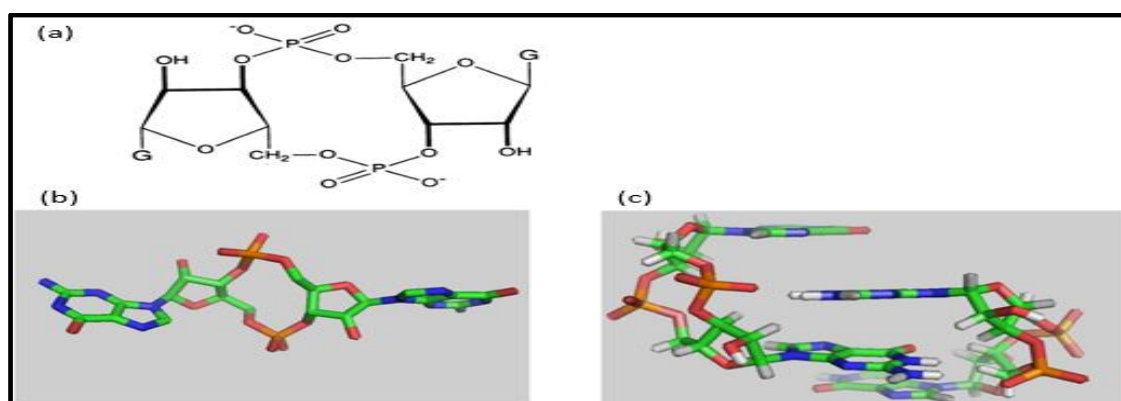


Figura 1.1. La molécula de c-di-GMP. (a) Esquema de la estructura química del c-di-GMP (G=Guanina). (Imagen adaptada de Ref. 97). (b) Estructura tridimensional del monómero de c-di-GMP, comúnmente encontrado en la interacción con dominios EAL. (c) Estructura tridimensional del dímero de c-di-GMP, comúnmente asociado a sitios de regulación alostérica y proteínas efectoras de c-di-GMP. (Imágenes (b) y (c) adaptadas de Ref. 123) (Verde=C; Azul=N; Rojo=O; Naranja=P).

Homeostasis de c-di-GMP

Dada la implicancia que este segundo mensajero posee en la regulación de procesos, el control de su concentración intracelular debe estar muy finamente ajustado.

Los niveles intracelulares de c-di-GMP se encuentran determinados por un balance entre la acción de enzimas que lo sintetizan, llamadas diguanilato ciclasas (DGC), y enzimas que lo degradan, llamadas fosfodiesterasas (PDE). Ambos tipos de proteínas poseen dominios conservados cuyas denominaciones hacen referencia a los residuos aminoacídicos en sus sitios catalíticos: en el caso de las DGC dominios GGDEF y en el

caso de las PDE dominios EAL o HD-GYP (Figura 1.2). La actividad de estas proteínas puede ser regulada por señales tanto del exterior como del interior celular. Por este motivo, es muy común encontrar a los dominios catalíticos asociados con dominios sensores, que permiten modificar la síntesis o degradación de c-di-GMP a partir del reconocimiento de algún estímulo.

Además de proteínas que poseen un único dominio ya sea asociado a la síntesis o a la degradación de c-di-GMP, también es muy común encontrar proteínas multidominio que presentan dominios GGDEF y EAL combinados^{102,103}.

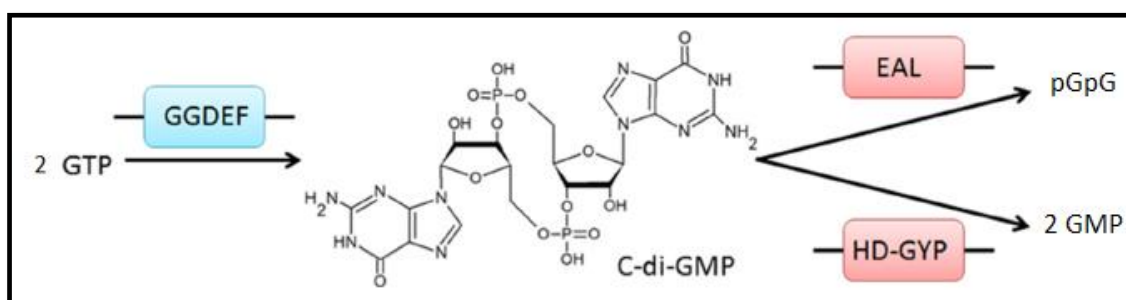


Figura 1.2. Las DGCs catalizan la síntesis de c-di-GMP a partir de 2 moléculas de GTP a través de su dominio GGDEF. Las PDEs catalizan la degradación de c-di-GMP. Según el dominio involucrado el producto de degradación será distinto: las PDE con dominio EAL degradan a 2 moléculas de GMP mientras que las PDE con dominio HD-GYP degradan a pGpG. (Imagen adaptada de Ref. 95).

Síntesis de c-di-GMP: Diguanilato ciclasas

Las primeras evidencias que asociaron a los dominios GGDEF con la síntesis de c-di-GMP provinieron de estudios genéticos, con experimentos de complementación en los cuales la introducción de una proteína con dominio GGDEF regulaba positivamente la biosíntesis de celulosa, fenotipo que había sido asociado a un aumento de c-di-GMP¹⁰⁴. Esta idea terminó de confirmarse en los años subsiguientes, con ensayos similares al mencionado anteriormente, pero evaluando directamente los niveles de c-di-GMP por métodos cromatográficos^{105,106}.

La secuencia consenso del motivo catalítico de esta familia de proteínas es GG(D/E)EF (Figura 1.3). Numerosos estudios han demostrado que la conservación de este motivo en las proteínas con dominio GGDEF es un fuerte indicio de que la misma podría presentar actividad DGC. Por el contrario, proteínas con dominios GGDEF que poseen el sitio catalítico degenerado a menudo no presentan actividad catalítica detectable¹⁰⁷. La dependencia de la actividad con la conservación del motivo GGDEF se refuerza por un gran número de estudios genéticos en los cuales se genera una variante no catalítica

a partir de una variante catalítica con tan solo la modificación de un par de aminoácidos en la secuencia mencionada^{90,108}.

Las DGC presentan frecuentemente inhibición por producto, que ocurre cuando la molécula de c-di-GMP se une a un sitio inhibitorio (*I-site*) presente en algunos dominios GGDEF, cuya secuencia es RxxD (Figura 1.3). Se ha estimado que aproximadamente un 60% de los dominios GGDEF que presentan un sitio activo conservado también presentan el motivo RxxD, lo que sugiere que podrían estar sujetos a este tipo de regulación. La modulación de la actividad DGC por unión de c-di-GMP al *I-site* del dominio GGDEF ha sido demostrada experimentalmente¹⁰⁹. Adicionalmente, se ha descrito que el *I-site* es necesario para la interacción de una DGC con su proteína efectora¹¹⁰.



Figura 1.3. Esquema de la secuencia consenso del motivo GGDEF, obtenida con el programa SeqLogo a partir del alineamiento de 37 secuencias de dominios GGDEF de la base de datos Pfam (Imagen adaptada de Ref. 106) (R=Arginina; D=Aspartato; G=Glicina; E=Glutamato; F=Fenilalanina).

A través de análisis filogenéticos y estructurales se pudo determinar que el dominio GGDEF presenta una gran similitud en estructura secundaria y terciaria con la familia de las nucleotidil-ciclasas de clase III, cuyo mecanismo catalítico depende de la dimerización de dos dominios para la formación de un homodímero. Esta similitud llevó a plantear la hipótesis de que los dominios GGDEF también podrían actuar a través de un mecanismo similar, donde dos monómeros se unirían para formar un sitio activo en la interfase. Este mecanismo propuesto fue posteriormente corroborado en forma experimental¹¹¹.

Un modelo que explica en detalle la catálisis de c-di-GMP por los dominios GGDEF ha sido derivado de la estructura cristalina de la DGC DgcZ de *Escherichia coli*, la cual consta de dos monómeros de GGDEF intercalados por una molécula de c-di-GMP (Figura 1.4.a). Según este modelo, para que ocurra la reacción de ciclación, dos moléculas de GTP tienen que estar alineadas en orientación antiparalela, lo que se consigue a partir de la unión de GTP por cada uno de los monómeros GGDEF y la posterior dimerización de los mismos¹¹². La reacción de catálisis de c-di-GMP transcurre

en dos pasos. En primer lugar, se produce un ataque nucleofílico del OH 3' de una molécula de GTP sobre el fosfato alfa de la molécula opuesta, lo que da lugar a la formación de un intermediario 5' pppGpG y la liberación de una molécula de pirofosfato (PPi). En el segundo paso, se libera del intermediario cíclico otra molécula de PPi dando lugar a la formación de la molécula de c-di-GMP (Figura 1.4.b).

Además de proteínas con el motivo GG(D/E)EF conservado, dentro de la familia de proteínas GGDEF existen proteínas con motivos que se desvían de la secuencia consenso, las cuales son catalíticamente inactivas. Sin embargo, se ha demostrado que estos dominios "GGDEF degenerados" pueden cumplir roles regulatorios gracias a la capacidad de unir c-di-GMP. Este es el caso de la proteína PelD de *Pseudomonas aeruginosa*, que participa en la regulación de la transición entre vida planctónica y sésil. A pesar de no poseer actividad catalítica, se demostró que la unión de c-di-GMP en el sitio de inhibición (*I-site*) del dominio GGDEF es necesaria para la producción de un polisacárido importante para la formación de *biofilm*¹¹³. Otro ejemplo relevante es el de MxdA, una proteína GGDEF degenerada de *Shewanella oneidensis* que participa en una vía similar a la de PelD, pero con la particularidad de ser capaz de unir c-di-GMP sin presentar un *I-site* conservado¹¹⁴.

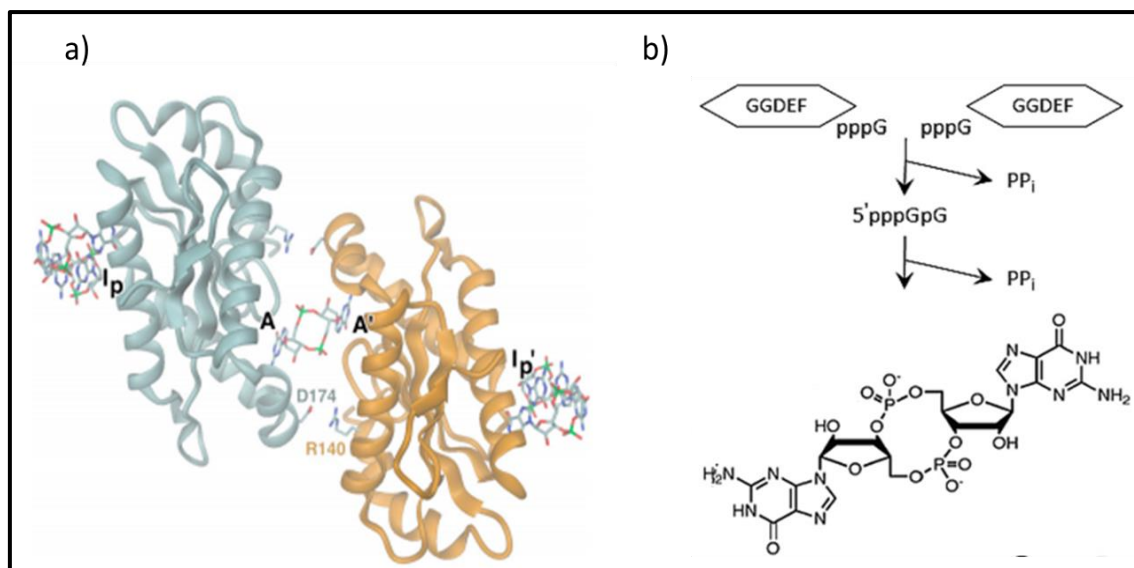


Figura 1.4. a) Estructura cristalina del dominio GGDEF de DgcZ de *E. coli*. Dos dominios GGDEF se encuentran unidos a través de una molécula de c-di-GMP, que interacciona con los sitios A de cada monómero. b) Mecanismo simplificado de la síntesis de c-di-GMP. La reacción transcurre en dos pasos, a través de la formación del intermediario 5' pppGpG (Imagen adaptada de Ref. 123).

Degradación de c-di-GMP: Fosfodiesterasas

Proteínas con dominio EAL

Las fosfodiesterasas específicas de c-di-GMP que poseen dominios EAL catalizan la degradación de c-di-GMP en presencia de Mg^{+2} o Mn^{+2} para dar el nucleótido lineal 5'-fosfoguanilil-(3'-5')-guanosina (pGpG).

A diferencia de los dominios GGDEF, en los cuales la dimerización es parte esencial del mecanismo catalítico, los dominios EAL parecen retener cierta actividad fosfodiesterasa cuando se encuentran como monómeros¹¹⁵. Sin embargo, la mayor parte de las proteínas con dominios EAL caracterizadas presentan dimerización y este proceso parece ser importante para la respuesta a estímulos ambientales, lo que lleva a la asunción de que la estructura dimérica sería la unidad funcional involucrada en la hidrólisis de c-di-GMP *in vivo*¹¹⁶⁻¹¹⁸.

Al igual que con las proteínas GGDEF, algunas proteínas con dominio EAL presentan sitios activos degenerados y son incapaces de catalizar la degradación de c-di-GMP. Se han reportado varios ejemplos de este tipo de proteínas que aún son capaces de unir el segundo mensajero con alta afinidad y funcionan como receptores de c-di-GMP, lo que les permite ejercer efectos regulatorios a partir de interacción con otras proteínas, como se describe más adelante^{119,120}.

Proteínas con dominio HD-GYP

Este tipo de fosfodiesterasas específicas de c-di-GMP catalizan la degradación del segundo mensajero a dos GMP. El dominio HD-GYP constituye un subgrupo dentro de la gran familia de proteínas HD, que presentan actividad hidrolítica hacia una gran variedad de sustratos. El primer indicio de que este tipo de dominios podía estar involucrado en la degradación de c-di-GMP surgió a partir de la observación de que solía encontrarse en proteínas multidominio junto con el dominio GGDEF¹²¹. Dicha hipótesis se comprobó en los años subsiguientes en un gran número de proteínas con dominio HD-GYP a través de ensayos de sobreexpresión y cuantificación de los productos de degradación de c-di-GMP por métodos cromatográficos^{122,123}. El mecanismo catalítico aún no se conoce detalladamente debido a las dificultades que ha presentado su purificación y cristalización¹²⁴.

Proteínas “bifuncionales”

Es frecuente encontrar en los genomas bacterianos genes que codifican para proteínas híbridas en donde se combinan dominios GGDEF/EAL o GGDEF/HD-GYP. Mediante un

análisis de genómica comparativa se determinó que un tercio del total de los dominios GGDEF se encuentran formando parte de proteínas GGDEF-EAL, mientras que para el caso de los dominios EAL esta proporción asciende a dos tercios. En el caso de los dominios HD-GYP, sólo el 7% se encuentra formando parte de proteínas híbridas¹²⁵. Aproximadamente la mitad de las proteínas GGDEF/EAL presentan sitios activos intactos, lo que sugiere que podrían presentar tanto actividad DGC como PDE. Sin embargo, se han descrito sólo unos pocos casos de proteínas híbridas que realmente posean la capacidad de llevar a cabo tanto la síntesis como la degradación de c-di-GMP. Un ejemplo es la proteína DcpA de *Mycobacterium smegmatis*, que puede actuar como DGC o PDE según el estado metabólico de la bacteria¹²⁶. Por otro lado, existen reportes de proteínas híbridas que presentan solo una de las actividades catalíticas, en donde el dominio no catalítico podría haber evolucionado para cumplir otras funciones. Un ejemplo es la proteína GGDEF-EAL CC396 de *Caulobacter crescentus*, que presenta actividad fosfodiesterasa dependiente de la unión de GTP en el dominio GGDEF no catalítico¹²⁷.

Un mecanismo interesante ha sido descrito en varias proteínas que poseen motivos EAL degenerados y no catalíticos, pero siguen teniendo la capacidad de unir c-di-GMP, lo que le confiere funciones regulatorias. La proteína FimX de *P. aeruginosa* presenta un dominio EAL incapaz de llevar a cabo la degradación del segundo mensajero por poseer el motivo catalítico no conservado, el cual sin embargo sigue siendo capaz de unir la molécula con alta afinidad¹²⁸. La unión del segundo mensajero en el dominio EAL degenerado induce un cambio conformacional en la proteína, que a su vez favorece su localización en el polo de la célula y de esta manera la regulación del ensamblaje del pili tipo IV involucrado en la movilidad tipo *twitching*¹²⁰. Otro ejemplo interesante es el de la proteína de membrana LapD de *Pseudomonas fluorescens*. Esta proteína está involucrada en la regulación de *biofilm* de la bacteria a través del control de la localización de la adhesina LapA, esencial para este proceso. LapD une c-di-GMP en su dominio EAL degenerado citoplasmático, lo que se traduce en un cambio conformacional que favorece la interacción de su dominio periplasmático con la proteasa periplasmática LapG, que regula la localización de LapA¹¹⁹.

Rol de los dominios accesorios en la regulación de las DGC y PDE

La búsqueda e identificación generalizada de dominios asociados a la síntesis y degradación de c-di-GMP en genomas bacterianos llevó a observar que a menudo se encuentran formando parte de proteínas multidominio, en las cuales en la región C-terminal se encuentra el dominio catalítico (GGDEF/EAL/HD-GYP) y en la región N-

terminal uno o más dominios accesorios. La identidad de estos últimos es variable, pero en general pertenecen a alguna familia de dominios asociada a transducción de señales¹²⁹. Esta observación permitió hipotetizar que la actividad catalítica de los dominios GGDEF, EAL o HD-GYP podría encontrarse a menudo regulada por distintos tipos de señales, tanto extracelulares como intracelulares. De esta manera, un cambio en la concentración de un determinado metabolito se traduciría en una modificación de la síntesis y/o degradación de c-di-GMP en la célula.

A continuación, se describen algunos de los dominios accesorios más frecuentemente encontrados en proteínas relacionadas al metabolismo de c-di-GMP. Los mecanismos por los cuales estos dominios regulan la actividad de sus dominios GGDEF y EAL asociados han sido descritos en algunos casos.

Dominio REC

Alrededor del 10% de las proteínas con dominio GGDEF y 5 % de las proteínas con dominio EAL se encuentran acompañados por dominios REC (*receiver*), que son capaces de recibir grupos fosfatos de proteínas donoras y se encuentran comúnmente en reguladores de respuesta de sistemas de dos componentes¹³⁰.

Dos ejemplos de proteínas que combinan dominios REC con dominios GGDEF han sido descritas en detalle a nivel estructural y mecanístico gracias al uso de técnicas cristalográficas. La proteína GGDEF PleD de *C. crescentus* presenta dos dominios REC en el N-terminal. Se ha demostrado que ante la fosforilación de uno de ellos en un residuo conservado, se produce la dimerización de la proteína y sólo cuando esta estructura cuaternaria se encuentra presente la misma puede llevar a cabo su función relacionada al control del ciclo celular^{111,131}. Otro ejemplo descrito detalladamente es el de la proteína GGDEF WspR de *P. aeruginosa*. En esta proteína con estructura REC-GGDEF el dominio N-terminal es importante para la formación de tetrámeros, estructura en la cual se ha observado que la proteína presenta actividad ciclasa¹³².

También ha sido descrito un ejemplo en el cual un dominio de la familia REC acompaña a un dominio fosfodiesterasa EAL. En la proteína RocR de *P. aeruginosa*, la fosforilación en el dominio REC induce la oligomerización de la proteína y produce un aumento en la actividad degradadora de c-di-GMP¹³³.

Dominio PAS

Este tipo de dominio es conocido por su rol en la percepción de cambios en los niveles de oxígeno, intensidad de luz, potencial redox, entre otros. Son capaces de sensar ligandos como oxígeno, monóxido de carbono y óxido nítrico¹³⁴. Se han descrito casos de proteínas GGDEF-EAL de *G. xylinum* y *E. coli* cuya actividad se ve inhibida cuando

el oxígeno se une al dominio PAS a través de un grupo hemo^{135,136}. En *Burkholderia cenocepacia*, la proteína RpfR tiene actividad fosfodiesterasa sólo cuando su dominio PAS une una molécula de *quorum sensing*¹³⁷. Además, se han descrito otros ejemplos en los cuales el dominio PAS es esencial para la dimerización del dominio GGDEF asociado y por lo tanto para la síntesis de c-di-GMP¹³⁸.

Sensores acoplados a globina (GCS)

Las globinas son proteínas que presentan grupo hemo como cofactor y son capaces de unir y/o transportar oxígeno. A menudo forman parte de proteínas en las cuales el N-terminal es un dominio globina y el C-terminal un dominio asociado a transducción de señales de naturaleza variable, entre los que se encuentra el dominio GGDEF¹³⁹.

Dentro de este tipo de sensores se encuentra la proteína BpeGreg de *B. pertussis*, que resulta de particular interés para esta tesis debido a que es la única descripción de una DGC en esta bacteria hasta el momento. Wan y colaboradores demostraron que esta proteína es capaz de sintetizar c-di-GMP a partir de GTP *in vitro*, actividad que se vio incrementada al aumentar la concentración de oxígeno disponible. En línea con este resultado observaron una sutil disminución en la formación de *biofilm* en una mutante delecional en BpeGreg, lo que sugiere que la proteína podría estar contribuyendo a la regulación de este fenotipo a través del aumento de los niveles de c-di-GMP en la célula¹⁴⁰.

El estudio del mecanismo por el cual el dominio GCS regula la actividad de BpeGreg ha sido abordado en varios trabajos. A través de diferentes análisis bioquímicos se pudo determinar que la unión de oxígeno al grupo hemo induce el estado tetramérico de la proteína en solución, el cual presenta una mayor actividad catalítica¹⁴¹. Además, mediante ensayos de mutagénesis sitio dirigida se pudo confirmar la importancia del sitio de unión del grupo hemo en el dominio globina para la regulación de la actividad DGC¹⁴². Por último, a partir de la obtención de la estructura cristalina de BpeGreg, se determinó que la unión de oxígeno en el grupo hemo genera una distorsión conformacional que se propaga a través de la proteína modificando la actividad del dominio GGDEF en el C-terminal¹⁴³.

Dominio GAF

Comprende una de las familias de dominios más extendidas en todos los reinos de la vida. Se encuentra típicamente en proteínas que forman homodímeros, como por ejemplo las fosfodiesterasas eucarióticas. Se considera que su tendencia a la dimerización no es muy alta ya que a menudo suelen encontrarse en forma disociada, aunque la unión de un ligando específico puede inducir fuertemente la formación de

estructuras cuaternarias^{144,145}. La naturaleza de estos ligandos puede ser muy variada. En diferentes proteínas, los dominios GAF pueden unir ligandos tales como nucleótidos cíclicos¹⁴⁵, bilinas¹⁴⁶, grupo hemo¹⁴⁷, *clusters* hierro-azufre¹⁴⁸, entre otros.

Una subfamilia de dominios GAF ha evolucionado como dominio de unión a nucleótidos cíclicos, ampliamente estudiados por su importancia en la regulación de la actividad de fosfodiesterasas (PDE) de mamíferos. Estos dominios se encuentran en la región N-terminal de esas proteínas y regulan alostéricamente su actividad catalítica. Las PDE han sido estudiadas en detalle en eucariotas, ya que llevan a cabo la degradación de AMPc y GMPc, dos segundos mensajeros que participan en numerosas vías de señalización, muchas de ellas asociadas a distintos tipos de enfermedades¹⁴⁹. El estudio de varias de estas proteínas ha demostrado que la regulación alostérica mediada por el dominio GAF puede modificar la actividad de la proteína de la cual forma parte de diversas maneras. La unión de GMPc a los dominios GAF de PDE2 y PDE5 aumenta la actividad catalítica del respectivo dominio fosfodiesterasa^{150,151}. Por otro lado, la unión de GMPc al dominio GAF de PDE6 inhibe la actividad catalítica al aumentar la afinidad de PDE6 por una proteína represora^{152,153}.

En bacterias, se ha asociado a los dominios GAF con funciones variadas: sensado de oxígeno (a través de cofactores como el grupo hemo o *clusters* hierro-azufre), control de la actividad adenilato ciclasa por unión directa de AMPc, sensado de luz en fitocromos bacterianos, participación en interacciones proteína-proteína, entre otras^{148,154,155,156}.

En los últimos años se han reportado numerosos ejemplos de la asociación de dominios GAF con dominios relacionados al metabolismo de c-di-GMP. Al igual que lo descrito para eucariotas, la gama de ligandos que pueden ser sensados por estos dominios es muy amplia. La actividad DGC de Lcd1 de *Leptospira interrogans* depende de la unión de AMPc al dominio GAF, lo que induce la dimerización de la proteína permitiendo la catálisis¹⁵⁷. Por su parte, la proteína DcpA de *M. smegmatis* con arquitectura GAF-GGDEF-EAL presenta ambas actividades catalíticas y se encuentra regulada por la unión de GDP al dominio GAF, lo que produce cambios conformacionales que modifican la actividad de la proteína¹²⁶. Estos ejemplos serán descritos en mayor detalle más adelante en este trabajo.

Dominios periplasmáticos

Otro grupo importante de dominios accesorios está compuesto por sensores anclados a la membrana que combinan dominios GGDEF, EAL o HD-GYP con dominios sensores periplasmáticos o extracelulares como HAMP, CHASE, CACHE y CSS. Dos ejemplos destacables son los de la PDE de *E. coli* PdeC y la DGC de *P. fluorescens* GcbC. La

primera posee un dominio CSS periplasmático que sensa el estado redox y regula la actividad del dominio EAL en respuesta a cambios en el mismo¹⁵⁸, mientras que la segunda posee un dominio CACHE N-terminal que induce la activación de la actividad catalítica del GGDEF C-terminal luego de unir citrato en el periplasma¹⁵⁹.

Proteínas efectoras de c-di-GMP

Una de las incógnitas más importantes en la transducción de señales por c-di-GMP tiene que ver con el mecanismo por el cual este segundo mensajero impacta sobre los procesos fisiológicos que regula. Como se mencionó anteriormente, las proteínas involucradas en la síntesis y degradación de c-di-GMP son fácilmente identificables debido a la presencia de dominios conservados. Sin embargo, las proteínas receptoras y/o efectoras de c-di-GMP representan un desafío más complejo debido a que la molécula es capaz de unirse a diversas clases de proteínas que no necesariamente presentan similitud a nivel de secuencia y/o estructura.

Los efectores descritos hasta el momento podrían agruparse en cuatro familias:

Proteínas con dominios PilZ

La primera proteína con este dominio fue identificada en *P. aeruginosa*, como reguladora del ensamblado del pili tipo IV¹⁶⁰.

A partir del avance de las técnicas de secuenciación masiva, la búsqueda de dominios PilZ en los genomas bacterianos reveló que suelen encontrarse formando parte de proteínas multidominio. Debido al conocimiento de que algunas de estas proteínas participaban en el control de procesos dependientes de c-di-GMP, y a la similar distribución filogenética del dominio PilZ respecto a las de los dominios GGDEF y EAL, el mismo fue propuesto como dominio receptor de c-di-GMP¹⁶¹. Posteriormente fue demostrado experimentalmente que una proteína con dominio PilZ de *E. coli* une c-di-GMP con alta afinidad y que esta interacción es esencial para su capacidad de inhibir la movilidad bacteriana¹⁶². A partir de allí se han reportado numerosos casos de proteínas con dominio PilZ capaces de unir c-di-GMP y análisis estructurales han permitido la caracterización de los motivos conservados importantes para la interacción¹⁶³.

Las proteínas que poseen dominios PilZ tienen gran diversidad en longitud y composición de dominios. Aproximadamente el 50% presentan como único dominio a PilZ pero también puede encontrarse formando parte de proteínas multidominio junto con dominios YcgR_N, de unión a ADN, dominios REC, GGDEF, EAL, quimiotaxis, entre otros¹⁶⁴.

La función de estas proteínas es muy variada. En general, la unión de c-di-GMP al dominio PilZ aumenta la afinidad de interacción con otras proteínas, formando heterodímeros. Los efectos son variables según la identidad de las proteínas a las cuales se unen. La proteína HapZ de *P. aeruginosa* une c-di-GMP y esta interacción aumenta su afinidad por la proteína SagS, parte de un sistema de dos componentes que participa en la regulación de la transición entre formación de *biofilm* y movilidad¹⁶⁵. Por su parte, la proteína YcgR de *E. coli* es capaz de interaccionar directamente con las proteínas FliG y FliM, ambas componentes del motor flagelar, interfiriendo con la generación de la fuerza de torque necesaria para el movimiento del flagelo. La unión de c-di-GMP al dominio PilZ de YcgR aumenta drásticamente la afinidad de estas interacciones, lo que se traduce en una menor rotación del flagelo y por lo tanto una reducción en la movilidad¹⁶⁶.

Recientemente ha sido descrito el rol de la proteína MrkH de *Klebsiella pneumoniae*, que es capaz de activar genes involucrados en la formación de *biofilm* por unión directa al ADN a través de su dominio PilZ, interacción que se ve inducida por la unión de c-di-GMP¹⁶⁷.

Reguladores transcripcionales

Este tipo de efectores son factores de transcripción capaces de unir c-di-GMP y que modifican su afinidad por el ADN como consecuencia de esta interacción. Se han descrito varios ejemplos dentro de este grupo de efectores. HpoR es un represor transcripcional que inhibe la expresión de genes involucrados en la resistencia a estrés oxidativo en *M. smegmatis*. La unión de c-di-GMP al represor disminuye su afinidad por el ADN, lo que libera la inhibición de la expresión¹⁶⁸. Por otro lado, los factores de transcripción VpsT de *Vibrio cholerae* y FleQ de *P. aeruginosa* regulan genes involucrados en la formación de *biofilm* y su afinidad por el ADN aumenta drásticamente tras la unión a c-di-GMP^{100,169}.

ARN Riboswitch

Este tipo de moléculas son secuencias de ARN no codificantes comúnmente presentes en la región 5' no traducida de una gran variedad de ARN mensajeros. Son capaces de adoptar estructuras secundarias específicas y suelen unir uno o más ligandos, tras lo cual modifican los niveles de expresión o traducción del mensajero del que forman parte¹⁷⁰.

A diferencia de la mayoría de los *riboswitches*, que regulan genes que están relacionados con el metabolismo del ligando que unen, los *riboswitches* que unen c-di-GMP raramente regulan la expresión de genes involucrados en el metabolismo del

segundo mensajero. En su lugar suelen encontrarse regulando genes relacionados a diversos procesos como movilidad, quimiotaxis, adhesión, entre otros¹⁷¹.

Proteínas con dominio GGDEF y EAL degenerados

Existen casos en que los dominios GGDEF y EAL no presentan el motivo conservado necesario para la catálisis en su sitio activo, pero retienen la capacidad de unir c-di-GMP.

Los dominios GGDEF unen c-di-GMP a través de su sitio de inhibición alostérica (*I-site*), el cual participa en la inhibición por producto en las proteínas catalíticas, mientras que en las no catalíticas cumple funciones regulatorias. Un ejemplo es la proteína histidina quinasa SgmT de *Myxococcus xanthus*, que entre sus dominios posee un GGDEF degenerado. La unión de c-di-GMP en el *I-site* de esta proteína favorece el secuestro de la proteína en la membrana, lo que le impide participar en la transducción de señales por fosforilación¹⁷².

Una situación similar ocurre con los dominios EAL catalíticamente inactivos. La proteína LapD, involucrada en el control de la adhesión en *P. fluorescens*, une c-di-GMP a través de un dominio EAL degenerado. Esta unión induce una conformación en la cual LapD es capaz de controlar indirectamente los niveles de una adhesina de membrana externa, aumentando así la capacidad de formar *biofilm* de la bacteria¹⁷³. Otro ejemplo interesante es el de la proteína FimX de *P. aeruginosa*, involucrada en la regulación de la movilidad por pili. La unión de c-di-GMP al dominio EAL degenerado de esta proteína regula su localización subcelular, interfiriendo en su capacidad de establecer contacto con sus proteínas interactoras y dirigir el correcto ensamblaje del pili^{128,174}.

Especificidad de la señalización por c-di-GMP

La multitud de procesos que pueden ser regulados por c-di-GMP en la célula sugiere que deben existir mecanismos para asegurar que cada uno de ellos ocurra en el tiempo y espacio adecuados. La observación de que muchas bacterias presentan múltiples proteínas con dominios asociados a la síntesis y degradación de c-di-GMP sugiere que debe haber mecanismos que contribuyan a la especificidad de la señalización. En algunos organismos se observa un número importante de proteínas relacionadas a la homeostasis de c-di-GMP, como los casos de *P. aeruginosa* con 42 y *E. coli* con 29^{175,176}, por lo que resulta evidente que deben existir mecanismos regulatorios que garanticen que no todas las proteínas estén actuando en el mismo momento y lugar en la célula. Otra de las incógnitas que se plantean se relaciona con la concepción histórica de las bacterias como una unidad no compartimentalizada, dentro de la cual las

moléculas serían capaces de difundir libremente. Dentro de este paradigma, resulta difícil imaginar que una molécula pequeña y difusible como el c-di-GMP pueda regular un determinado proceso celular sin afectar otros. Sin embargo se han propuesto modelos de regulación basados en la fluctuación de concentraciones locales de c-di-GMP¹⁷⁷.

En los últimos años, numerosos estudios han puesto en evidencia que no todas las DGC y/o PDE controlan los mismos procesos celulares, sino más bien existe una especificidad donde determinadas DGC o PDE participan en la regulación de uno o varios fenotipos particulares. Esto ha sido demostrado con gran nivel de detalle en la bacteria modelo *E. coli* K-12, que codifica para 12 DGC en su genoma. A través de estudios de mutagénesis y funcionales, Hengge y colaboradores pudieron demostrar la participación de varias de ellas en el control de procesos específicos que ocurren simultáneamente en la célula^{178,179}. En forma similar, estudios mutacionales en distintas especies de *Pseudomonas*, que también presentan multiplicidad de DGC y PDE, demuestran que solo algunas de ellas se encuentran involucradas en el control de la formación y dispersión del *biofilm*^{173,180}.

Uno de los mecanismos que podrían aportar especificidad es la transcripción diferencial de los genes asociados al metabolismo de c-di-GMP. Es decir, que no todas las DGC y PDE se encuentran expresadas en el mismo momento en la célula. Estudios marcan que en *P. fluorescens* muchas de estas proteínas se regulan transcripcionalmente dependiendo de la disponibilidad de nutrientes en el entorno¹⁸¹ y en *E. coli* el factor sigma de estrés RpoS dirige la expresión de la mayoría de los genes que codifican para DGC y PDE¹⁸². Sin embargo, en un análisis sistemático realizado en *E. coli* por Sarenko y colaboradores se obtuvieron resultados que contradicen esta visión¹⁷⁶. En el mismo se determinó que en la condición en la cual c-di-GMP induce la expresión de los componentes del *biofilm*, casi todas las DGC y PDE se encuentran expresadas simultáneamente y con capacidad de producir c-di-GMP. Por lo tanto, para ese fenotipo particular, debe existir una especificidad que no dependa de la presencia o ausencia de las DGC y/o PDE.

Otro mecanismo que aporta a la especificidad de la señalización por c-di-GMP son las interacciones proteína-proteína entre enzimas específicas y sus correspondientes efectores o blancos moleculares. Un ejemplo estudiado en profundidad es el de la proteína de membrana interna LapD de *P. fluorescens* y su interacción con distintas DGC para regular la formación de *biofilm*. LapD es una proteína de membrana interna con capacidad de unir c-di-GMP, en respuesta a lo cual regula indirectamente la presencia en la membrana externa de la adhesina LapA, fundamental para la formación de *biofilm*^{119,183}. Dahlstrom y colaboradores demostraron que la especificidad de esta

regulación se basa en una interacción física entre LapD y la DGC GcbC¹⁸⁴. Esta interacción se ve reforzada por el sensado de citrato a través del dominio CACHE de GcbC, que tiene dos efectos: aumentar la actividad DGC de GcbC y estabilizar el complejo formado por GcbC y LapD, reforzando de esta manera la transferencia directa del c-di-GMP generado por GcbC a su efector LapD¹⁵⁹.

La localización de las proteínas en sitios particulares de la célula o su participación en complejos multiproteicos también pueden aportar a la especificidad de la señalización. En *Vibrio parahaemolyticus*, la proteína GGDEF-EAL ScrC se encuentra anclada a la membrana y actúa como DGC hasta que por unión de otra proteína cambia su actividad a PDE¹⁸⁵. Otro ejemplo proviene de estudios en *Bacillus subtilis*, donde una DGC citoplasmática no es capaz de complementar el rol de una DGC de membrana a menos que se la sobreexpresa¹⁸⁶. Este tipo de mecanismos sugiere que existe señalización local por c-di-GMP, donde distintas DGC y PDE aportan a esos *pools* locales que tendrán impacto en un único o reducido número de efectores de c-di-GMP¹⁸⁷.

Por último, la diferencia en la afinidad de unión a c-di-GMP de las proteínas efectoras determina que ciertos procesos dependientes de c-di-GMP necesitarán concentraciones más altas que otros para su regulación. Estudios en *Salmonella enterica* demostraron que dos proteínas PilZ involucradas en el control de dos fenotipos distintos presentaban una diferencia muy importante en su afinidad por c-di-GMP. La proteína con alta afinidad YcgR, involucrada en la inhibición de la movilidad, se activa con una concentración local de c-di-GMP mucho menor que la proteína de baja afinidad BcsA, que necesita una concentración mucho más elevada¹⁸⁸.

Regulación por c-di-GMP en *Bordetella*

Nuestro grupo de trabajo se encuentra abocado al estudio del rol del segundo mensajero c-di-GMP en procesos asociados a la patogénesis de bacterias del género *Bordetella*. Esta línea de investigación se inició con la demostración de que la sobreexpresión de una DGC activa en *B. bronchiseptica* induce un aumento en los niveles intracelulares de c-di-GMP, que se traduce en una inducción de la formación de *biofilm* y la represión de la movilidad bacteriana⁸⁵. En los años posteriores, nuestro grupo de trabajo ha intentado profundizar en los mecanismos por los cuales opera esta señalización.

En ese contexto, se describió el rol de la DGC BdcA en la regulación de la formación de *biofilm* y la movilidad, y se identificó a BB2109 como uno de los efectores moleculares de esta regulación⁹⁰. La descripción de este mecanismo será abordada más adelante en este trabajo.

Otro proceso descrito por nuestro laboratorio fue la regulación de la formación de *biofilm* por el sistema de proteínas Lap, análogo al descrito para *P. fluorescens*, y su dependencia con c-di-GMP. Este mecanismo regula la expresión de la adhesina BrtA en la membrana en forma dependiente de c-di-GMP, específicamente a través de la interacción entre BdcA y LapD en la membrana⁹¹.

Por último, un estudio transcriptómico publicado recientemente en el cual se evaluó la expresión génica en una condición de alto c-di-GMP demostró que este segundo mensajero regula negativamente la expresión de los genes del SST3, un factor de virulencia clave de *B. bronchiseptica*. Estos resultados fueron confirmados a través de la cuantificación de los ARN mensajeros y proteínas correspondientes. Adicionalmente, se demostró que los niveles elevados de c-di-GMP en esa cepa inducen una menor citotoxicidad en células eucariotas y una virulencia atenuada en un modelo murino⁸⁹.

El conjunto de estos resultados demuestra que c-di-GMP regula procesos celulares determinantes para la patogénesis de *B. bronchiseptica*. Dentro de esta línea de investigación, uno de los objetivos que persigue nuestro laboratorio es extender el estudio de este sistema de señalización a *B. pertussis*. Como se mencionó anteriormente, existe una estrecha relación filogenética y al nivel de los mecanismos de virulencia entre estas especies, por lo que resulta esperable que al menos algunos de los mecanismos regulatorios descritos en *B. bronchiseptica* se encuentren conservados en *B. pertussis*. Recientemente, Hiramatsu y colaboradores describieron una vía de señalización dependiente de c-di-GMP que regula la transición entre vida planctónica y sésil en *B. pertussis*¹⁸⁹. El sensado de una superficie a través del flagelo y la consecuente interferencia en la rotación flagelar, se traduce en el aumento de actividad de una DGC, que produce c-di-GMP e induce la expresión del sRNA Bpr4. Este sRNA, cuya expresión *in vivo* había sido reportada previamente¹⁹⁰, se une al RNAm de la adhesina FHA e impide su degradación, lo que tiene como consecuencia final una mayor adhesión de *B. pertussis* a la superficie. Este reporte constituye la primera evidencia de un rol para la señalización de c-di-GMP en la regulación de un proceso importante para la interacción de *B. pertussis* con su hospedador.

Si se establece una comparación entre el genoma de *B. pertussis* y el de *B. bronchiseptica*, puede observarse que la gran mayoría de los genes que codifican para DGC y PDE en *B. pertussis* tienen su respectivo homólogo en su antecesor evolutivo (Tabla 1.5). Es decir, son genes que podrían ser importantes en la regulación por c-di-GMP en ambas bacterias, probablemente a través de mecanismos conservados.

<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Bordetella pertussis</i>	Dominios	BB vs BP
BB1960	BP3507	GGDEF	99% identidad
BB2626	BP1441	GGDEF	99% identidad
BB3903	BP2465	GGDEF	100% identidad
BB4664	BP0338	GGDEF	99% identidad
BB2109	BP1092	GGDEF-EAL	99% identidad
BB2957	BP1592	GGDEF-EAL	99% identidad
BB2110	BP1460	GGDEF-EAL	100% identidad
BB2996	BP1876	EAL	99% identidad
BB1961	BP3508	HD-GYP	99% identidad
	BP1492	GGDEF	Sólo BP
BB2660		GGDEF	Sólo BB
BB3576		GGDEF	Sólo BB
BB1220		GGDEF	Sólo BB
BB3114		GGDEF	Sólo BB
BB0991		GGDEF	Sólo BB
BB2790		GGDEF	Sólo BB
BB3317		GGDEF-EAL	Sólo BB
BB3116		EAL	Sólo BB
BB3128		EAL	Sólo BB
BB2664		EAL	Sólo BB

Tabla 1.5. Comparación de los genes codificantes para proteínas relacionadas al metabolismo de c-di-GMP en *B. bronchiseptica* y *B. pertussis*.

La única excepción viene dada por el gen *bp1492*, que codificaría para una proteína GGDEF y que no presenta homólogo en *B. bronchiseptica*, lo que sugiere que fue incorporado al genoma de *B. pertussis* luego de la divergencia evolutiva de ambas especies de su ancestro común. Resultados de distintos trabajos en donde se analizó la expresión *in vivo* de *B. pertussis* sugieren que este gen podría tener una función importante en la patogénesis de la bacteria. Lamberti y colaboradores llevaron a cabo una comparación a nivel proteico con el objetivo de observar los perfiles de expresión de *B. pertussis* durante la infección de macrófagos THP-1. En ese contexto fue posible detectar la presencia de péptidos compatibles con BP1492 en las bacterias recuperadas de macrófagos 48 post-infección, mientras que no se observó expresión de la proteína en las bacterias antes de la infección¹⁹¹. En el mismo sentido, en un ensayo de transcriptómica realizado sobre bacterias recuperadas de pulmones de ratones infectados con *B. pertussis*, se pudo detectar la presencia del transcripto correspondiente al gen *bp1492* en las bacterias recuperadas de pulmón 3 días post-infección, mientras que no se detectó en las bacterias previo a la infección¹⁹².

Estos dos trabajos representan indicios concretos de que *bp1492* es un gen que se expresa en el contexto de la infección de organismos eucariotas por *B. pertussis*. Además, el aumento en la expresión sugiere que la proteína BP1492 sería importante en algún punto del desarrollo de la infección.

Por otro lado, una de las proteínas compartidas por ambas especies es la codificada por el gen *bp1092* en *B. pertussis* (*bb2109* en *B. bronchiseptica*). En un trabajo de análisis proteómico realizado por Lamberti y colaboradores, se encontró que la expresión de BP1092 se encuentra fuertemente inducida en bacterias recuperadas de macrófagos, lo que indica que podría cumplir algún rol en la interacción de *B. pertussis* con el hospedador¹⁹¹. En paralelo, en nuestro laboratorio hemos descrito a BB2109 como una proteína importante en la regulación de fenotipos asociados a c-di-GMP en *B. bronchiseptica*. Estos antecedentes apoyan la idea de que procesos dependientes de c-di-GMP podrían ser importantes para la patogénesis de *B. pertussis*, y que BP1092 podría ser uno de los factores involucrados en su regulación.

Hipótesis y objetivos

En el presente trabajo de tesis se busca abordar el estudio del rol del segundo mensajero c-di-GMP en la regulación de fenotipos asociados a la patogénesis de *B. pertussis*, con el objetivo de profundizar en el entendimiento de las vías de señalización que participan en el establecimiento de la infección. Los resultados obtenidos en *B. bronchiseptica* evidencian que c-di-GMP regula fenotipos asociados a la patogénesis en el género *Bordetella*. Dicha evidencia, sumada a la conservación de genes asociados al metabolismo de c-di-GMP en ambas especies, nos lleva a **hipotetizar** que este segundo mensajero sería importante en el control de procesos relacionados a la patogénesis de *B. pertussis*. En particular, **proponemos** que dos proteínas, que podrían regular la concentración de c-di-GMP, estarían involucradas en la patogénesis de *B. pertussis*. En este marco, se propone como objetivo global estudiar el rol de proteínas relacionadas al metabolismo de c-di-GMP en la regulación de fenotipos asociados a la virulencia de *B. pertussis*. Por un lado, se estudiará a la proteína codificada por el gen *bp1492*, una DGC exclusiva de *B. pertussis*. En forma independiente, se abordará el estudio de un sistema formado por una proteína efectora de c-di-GMP y una DGC de membrana.

Objetivos particulares:

- **Corroborar la actividad diguanilato ciclasa de BP1492**
- **Determinar el rol de BP1492 en fenotipos asociados a cdG**
- **Determinar fenotipos asociados a la actividad de BP1492**
- **Estudiar el rol de la proteína dual BP1092**
- **Identificar posibles pares interactores de BP1092**
- **Identificar las proteínas reguladas por el o los pares interactores encontrados.**

Capítulo II: Análisis *in silico* de BP1492

Introducción

Para comenzar el estudio del rol de la regulación por c-di-GMP en *B. pertussis* nos centramos en una proteína en particular con posible actividad diguanilato ciclasa, la codificada por el gen *bp1492*. Como punto de partida para la caracterización de la proteína, se llevó a cabo un análisis *in silico*. Mediante el uso de distintas herramientas bioinformáticas se obtuvieron indicios sobre la posible localización, estructura de dominios y actividad biológica de la misma.

Predicción de la estructura de dominios y localización de BP1492

Se obtuvo de la base de datos GenBank la secuencia de aminoácidos de la proteína, determinada a partir del genoma secuenciado de la cepa de *B. pertussis* Tohama I (GenBank: CAE41781.1).

Haciendo uso de la herramienta CD-Search, la cual utiliza una base de datos de dominios conservados (Conserved Domain Database), se pudo predecir la presencia de dos dominios en BP1492: un dominio GAF en el N-terminal y un dominio GGDEF en el C-terminal (Figura 2.1.a). El primero es un dominio regulatorio, comúnmente asociado a la unión de distintos tipos de ligandos. Por su parte, el dominio GGDEF está asociado a la producción del segundo mensajero c-di-GMP por su actividad DGC.

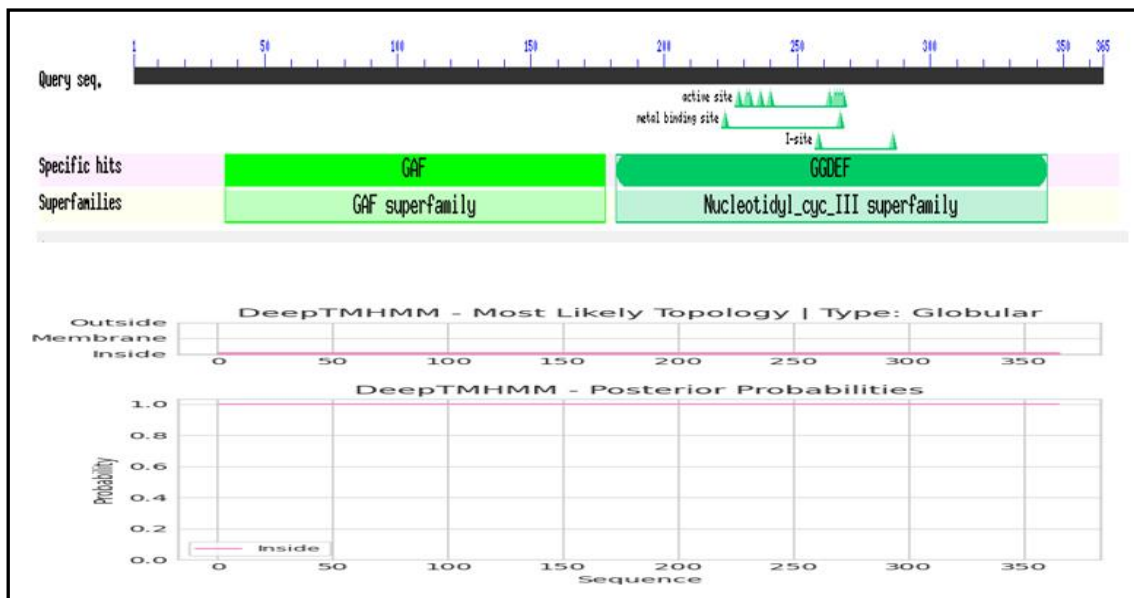


Figura 2.1. a) Predicción de la estructura de dominios de BP1492 con la herramienta CD-Search. b) Predicción de segmentos transmembrana y localización subcelular con el predictor DeepTMHMM.

Como se describió en la introducción, algunas DGC funcionan ancladas a la membrana celular, con un dominio N-terminal periplasmático involucrado en el reconocimiento de alguna señal y el dominio GGDEF en el C-terminal. La estructura de dominios de BP1492 no sugiere que esta proteína pudiera ser de membrana debido a que el dominio GAF comúnmente se encuentra formando parte de proteínas citoplasmáticas¹⁹³. Acorde con esta suposición, el uso del predictor de hélices transmembrana DeepTMHMM¹⁹⁴ arrojó como resultado una ausencia de segmentos transmembrana y una predicción de localización citoplasmática (Figura 2.1.b).

Dominio GGDEF

Como se mencionó en la introducción, la capacidad de un dominio GGDEF de catalizar la síntesis de c-di-GMP a partir de GTP se encuentra fuertemente asociada a la conservación de una serie de residuos de aminoácidos en posiciones determinadas. Por este motivo, a fin de predecir si el dominio GGDEF de BP1492 podría tener actividad catalítica, se realizó un análisis tanto a nivel de secuencia de aminoácidos como a nivel estructural. Para el mismo, se utilizó como referencia a la DGC PleD de *C. crescentus*, que se encuentra estudiada en gran detalle y puede considerarse como representativa de un dominio GGDEF catalíticamente activo^{111,131}.

Además del motivo GG(D/E)EF, que conforma el sitio catalítico de las DGC, se han descrito residuos adicionales que participan en la coordinación del GTP y los cationes de Mg⁺², que son sustrato y cofactor de la reacción de catálisis, respectivamente¹⁰⁷. Para evaluar la conservación de dichos residuos, se realizó un alineamiento de secuencias entre los dominios GGDEF de PleD y BP1492. En la figura 2.2.a se muestra una porción del alineamiento correspondiente a la región donde se encuentran los residuos descritos como importantes para la actividad. En el mismo se puede observar que BP1492 presenta una secuencia GGEEF, desde la posición 264 a la 268, idéntica a la que presenta PleD en la posición 368-372, resaltados en amarillo (Figura 2.2.a). Adicionalmente, también se encuentran conservadas las posiciones correspondientes a los residuos Asp327, Asn335 y Asp344 de PleD, resaltados en verde, rosa y naranja, respectivamente. El primero de ellos está involucrado en la coordinación del catión Mg⁺², esencial para la actividad catalítica. Los dos restantes participan en la interacción a través de puentes de hidrógeno con la base de guanina del sustrato GTP¹⁹⁵.

BP1492 también presenta conservado el motivo "RxxD" (resaltado en verde en la Figura 2.2.a) denominado *I-site* y que se encuentra en aproximadamente el 60% de las DGC. El mismo ha sido descrito en otras DGC como un sitio de inhibición por producto, la unión de c-di-GMP a este motivo inhibe la actividad catalítica de la proteína,

presumiblemente para evitar la depleción del GTP de la bacteria¹⁰⁹. Adicionalmente, y como se ha descrito en la introducción de este trabajo, también se ha demostrado que el *I-site* puede participar de la interacción entre una DGC y su proteína efectora, como es el caso del sistema formado por GcbC y LapD en *P. fluorescens*¹¹⁰.

Este análisis de secuencia nos induce a pensar que el dominio GGDEF de BP1492 sería capaz de sintetizar c-di-GMP, ya que presenta todas las características estructurales presentes en otras DGC para las cuales la actividad catalítica ya ha sido demostrada experimentalmente.

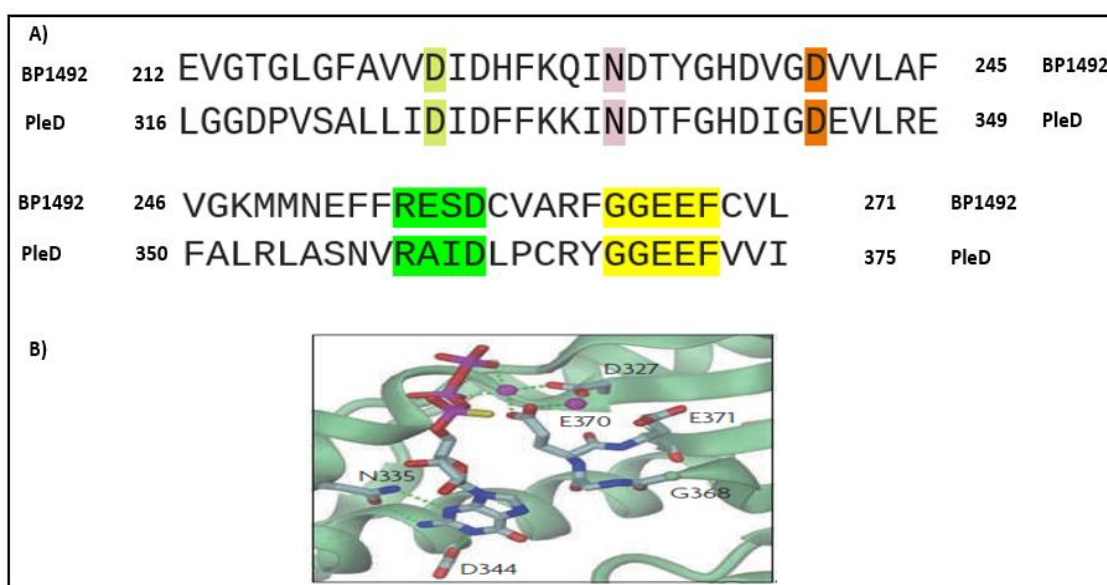


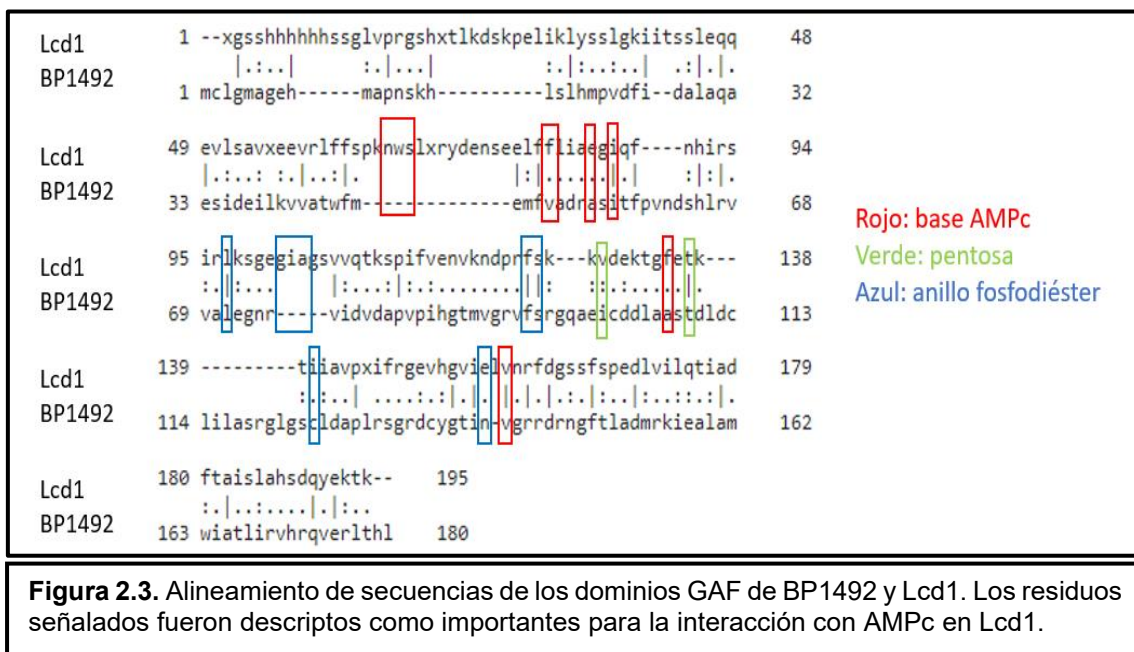
Figura 2.2. (a) Alineamiento de secuencias de aminoácidos de BP1492 y PleD. En amarillo se indica el motivo catalítico GG(D/E)EF. En verde se indica el sitio de inhibición RxxD. Los restantes 3 residuos resaltados participan en la coordinación del sustrato GTP y el cofactor Mg^{+2} . (b) Estructura del sitio activo de la diguanilato ciclasa PleD con GTP unido. En la misma se indican los aminoácidos importantes para la catálisis y la coordinación del sustrato resaltados en la figura 2(a) (Figura adaptada de Ref. 150).

Dominio GAF

La predicción de dominios indica que BP1492 presenta un dominio GAF en su porción N-terminal. Como se describió en la introducción, la familia de dominios GAF constituye una de las mayores familias de dominios regulatorios de unión de pequeñas moléculas. Su principal función consiste en sensor señales mediadas por esas moléculas, que pueden ser propias de un determinado proceso metabólico, condiciones del entorno, situaciones de estrés, etc.

La asociación con dominios relacionados al metabolismo de c-di-GMP ha sido descrita en algunos ejemplos particulares, donde se demostró que su principal rol está en controlar el estado oligomérico de la proteína y, por lo tanto, su actividad catalítica.

En un trabajo realizado por da Costa Vasconcelos y colaboradores, se describió una DGC de *Leptospira* cuya actividad se encuentra regulada por la unión del ligando AMPc en su dominio GAF N-terminal¹⁵⁷. En ese trabajo se cristalizó la proteína con el ligando, lo que permitió identificar los residuos de aminoácidos importantes para la unión del mismo. Con esta información, nos propusimos evaluar si estos residuos se encuentran conservados en el dominio GAF de BP1492, a fin de predecir si esta proteína también podría unir AMPc. Para ello, se realizó un alineamiento de los dominios GAF de ambas proteínas, que se muestra en la Figura 2.3. La mayor parte de los residuos descritos como importantes para la unión de AMPc al dominio GAF de Lcd1 no se encuentran conservados en el dominio GAF de BP1492, lo que sugiere que esta proteína no uniría AMPc.



Modelado de la estructura de BP1492

Para poder tener una aproximación a la estructura tridimensional de BP1492 se realizó una predicción utilizando el software AlphaFold2, considerado actualmente entre los mejores y más precisos programas de predicción estructural¹⁹⁶. La predicción se basa en la homología de la secuencia problema con secuencias que cuentan con estructuras tridimensionales determinadas experimentalmente. Una de las principales ventajas del método es que provee una estimación de la confiabilidad de la predicción por residuo (pLDDT), lo que permite evaluar la calidad del modelado obtenido para cada porción de la proteína.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de BP1492 con el programa AlphaFold2 arrojó la predicción de cinco posibles modelos, cada uno con un valor asociado de confiabilidad. En la Figura 2.4.a se muestra la visualización del modelo de mayor calidad, realizada con el programa UCSF Chimera¹⁹⁷. Además, se muestran los gráficos asociados a la confiabilidad de la predicción. Del análisis del gráfico 2.4.b se desprende que la predicción de la estructura de los dominios GAF y GGDEF es de muy alta calidad, ya que posee valores de pLDDT alto en esas regiones. Por otro lado, la confiabilidad de la predicción disminuye considerablemente hacia los extremos de la secuencia.

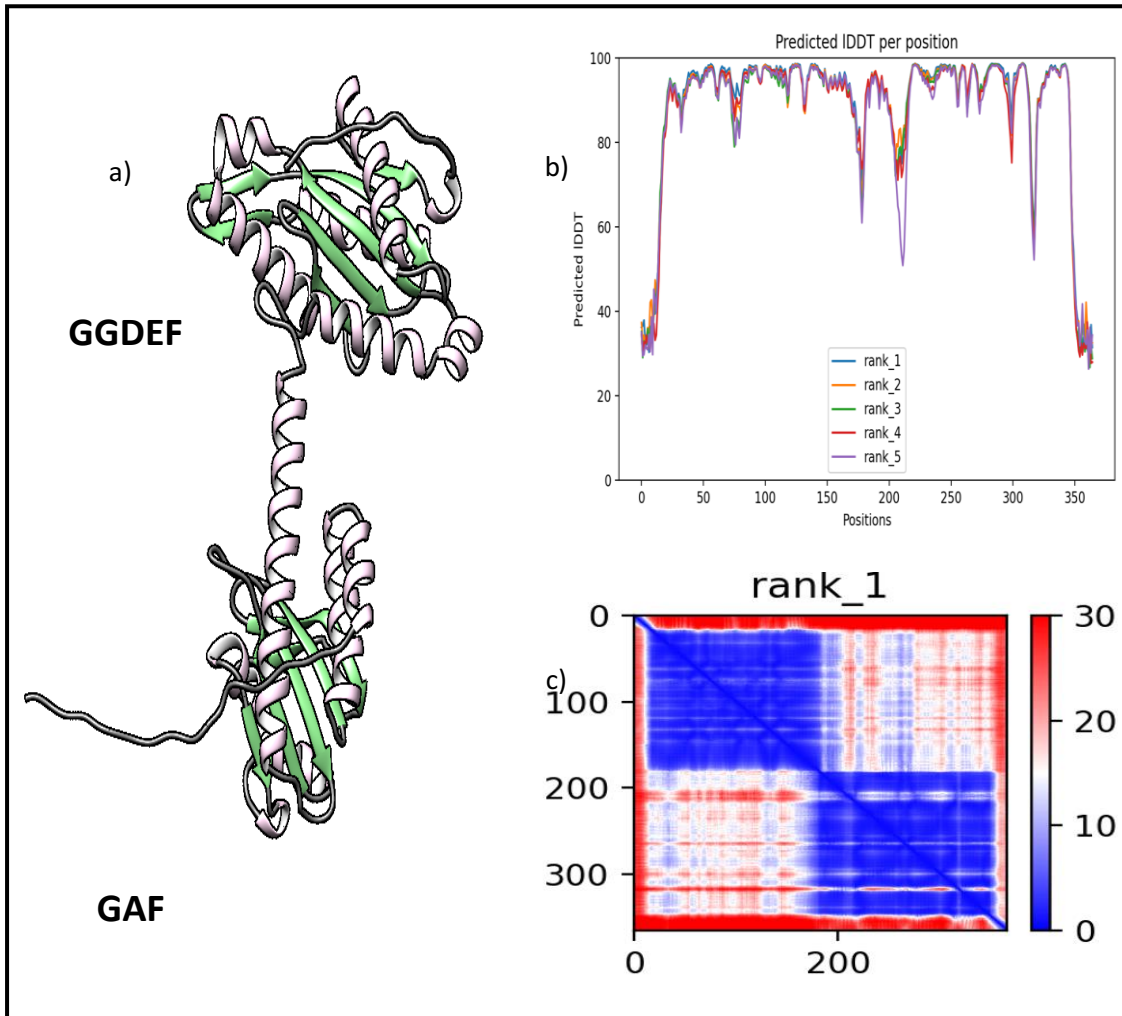


Figura 2.4. Modelado de BP1492 con AlphaFold2. a) Visualización del modelo obtenido con el programa Chimera. b) Gráfico del error por residuo. c) Gráfico del error del alineamiento por posición.

El gráfico 2.4.c muestra que la predicción de cada dominio por separado es muy confiable, como lo demuestra la presencia de dos cuadrantes bien marcados con valores de error tendiente a cero (color azul) en las esquinas superior izquierda (dominio GAF) e inferior derecha (dominio GGDEF). Adicionalmente, el análisis de este gráfico demuestra que el modelo no puede predecir con buena confiabilidad la posición de un

dominio respecto al otro, lo que se interpreta a partir del elevado grado de error (color rojo) que se observa en los cuadrantes inferior izquierdo y superior derecho.

Considerando que las DGC requieren dimerizarse para llevar a cabo su función, se modeló la estructura del posible dímero formado por dos monómeros de BP1492. Para ello, se utilizó como secuencia problema para el algoritmo una concatenación de dos secuencias de BP1492, lo que el programa reconoce como dos monómeros independientes. En la Figura 2.5.a se muestra el modelo obtenido. El mismo predice que cada dominio de un monómero de BP1492 dimerizaría con el dominio idéntico del otro monómero para formar el dímero.

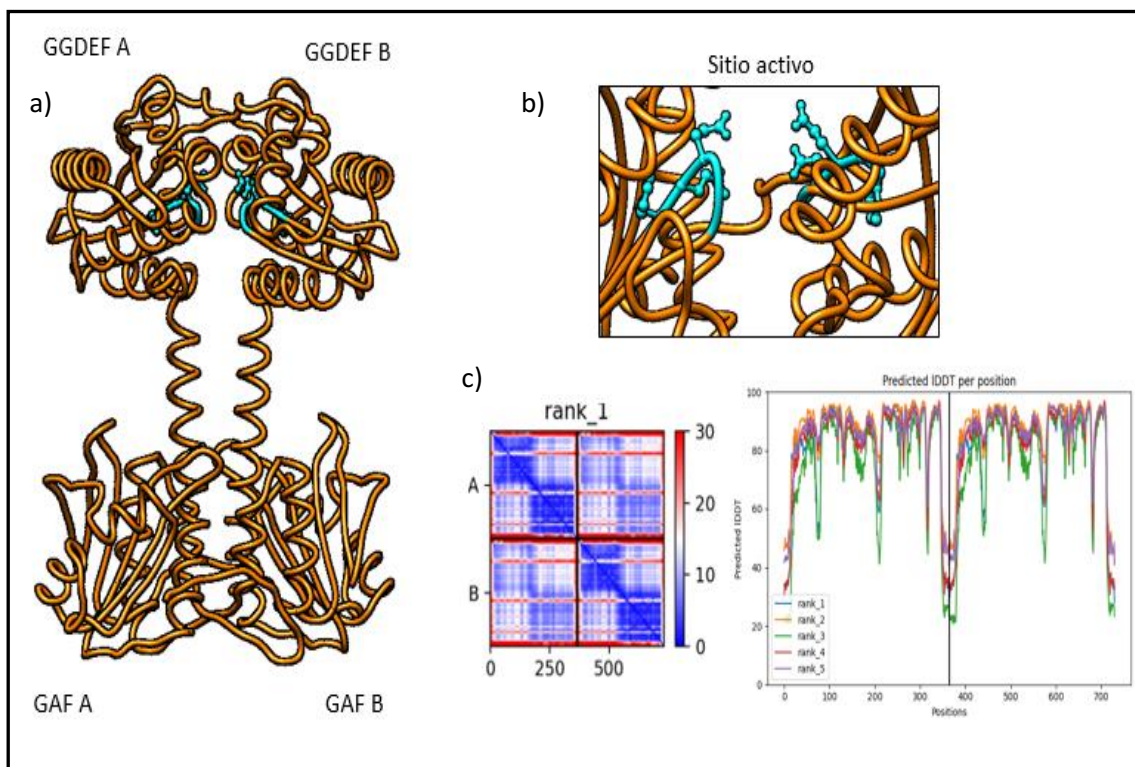


Figura 2.5. Modelado del dímero de BP1492. a) Modelo resultante de la predicción con el programa AlphaFold2. En celeste se indica el sitio activo. b) Ampliación del sitio activo formado por la dimerización de dos dominios GGDEF de BP1492 c) Parámetros de confiabilidad del modelo obtenido.

En la figura 2.5.b se muestra una ampliación del sitio catalítico del dímero, donde se resalta la secuencia GGEEF de cada monómero. Los gráficos asociados a la confiabilidad de la predicción (Figura 2.5.c) muestran que el modelo representa la dimerización con buen grado de precisión (predominio de puntajes tendientes a cero). En conclusión, se pudo generar un modelo confiable que representa la estructura tridimensional de ambos dominios de BP1492, aunque se debe ser cuidadoso con la predicción de la posición relativa de un dominio respecto al otro. Adicionalmente, la

predicción del dímero de BP1492 muestra que la dimerización ocurriría a través de los dominios idénticos de cada monómero (GAF-GAF y GGDEF-GGDEF).

Contexto genómico de *bp1492*

El contexto cromosómico del gen *bp1492* presenta un aspecto muy interesante, ya que se encuentra flanqueado por secuencias de inserción IS481. Este tipo de elemento genético móvil se encuentra presente en un alto número de copias en el genoma de *B. pertussis*, y se cree que ha contribuido enormemente a la evolución del genoma de este patógeno¹⁹⁸.

Una característica distintiva del genoma de *B. pertussis* es su alto contenido de GC. Sin embargo, el gen *bp1492* presenta un 58% de GC, lo que representa una importante desviación respecto al promedio del genoma (67,7%). Estas características nos llevan a hipotetizar que el gen *bp1492* pudo haber sido incorporado al genoma de *B. pertussis* mediante algún mecanismo de transferencia de material genético, luego de la divergencia evolutiva de *B. bronchiseptica*.

El gen *bp1492* se encuentra conservado en aislamientos clínicos de *B. pertussis*

El análisis inicial se realizó utilizando como herramienta de partida el genoma de referencia de la cepa Tohama I. Sin embargo, un genoma de referencia no siempre es representativo de las cepas circulantes en la población, especialmente en un patógeno que ha sido sometido a una fuerte presión de selección dada por las vacunas existentes contra la tos convulsa. Para comprobar si el gen *bp1492* se encuentra presente en aislamientos clínicos de *B. pertussis* circulantes, nos propusimos buscar la presencia de la secuencia nucleotídica de *bp1492* en genomas secuenciados de cepas clínicas aisladas recientemente.

En un trabajo científico publicado en 2013, se reportaron los genomas secuenciados de 28 aislamientos que habían sido obtenidos de casos clínicos de tos convulsa ocurridos durante 2010 y 2012 en Estados Unidos. Se utilizó la herramienta BLAST para buscar la secuencia nucleotídica de *bp1492* en esos genomas, utilizando la secuencia de *bp1492* de la cepa de referencia Tohama I (NCBI Reference Sequence: NC_002929.2). Se encontró que *bp1492* está presente en 25 de los 28 aislamientos mencionados¹⁹⁹. *B. pertussis* B1917 y B1920, dos cepas aisladas en Holanda en el año 2000, también mantienen *bp1492* intacto, al igual que las cepas VA-145 y VA-150, aisladas e identificadas por el *Virginia Department of Health*²⁰⁰.

Es importante destacar que en todas las búsquedas realizadas la conservación de *bp1492* a nivel de secuencia nucleotídica es de 100%.

Estos resultados demuestran que el gen *bp1492* se encuentra conservado en la población circulante de *B. pertussis*, lo que constituye un indicio de que podría ser importante para alguna etapa del proceso de infección.

Conclusiones y discusión

En el presente capítulo se utilizaron diversas herramientas computacionales con el objetivo de estudiar características de BP1492 que nos permitieran obtener indicios sobre su función.

El análisis de dominios conservados arrojó como resultado la predicción de una arquitectura GAF-GGDEF. El dominio GAF se encuentra acompañando al dominio GGDEF en aproximadamente el 4% de las DGC anotadas en la base de datos PFAM. Recientemente se han descrito algunos ejemplos particulares de proteínas GAF-GGDEF y se ha podido establecer el rol del dominio accesorio en la regulación de la actividad catalítica de esas proteínas. A través de la cristalización de la diguanilato ciclasa Dcsbis de *P. aeruginosa*, Chen y colaboradores pudieron demostrar que la proteína forma un dímero a través del dominio GAF, contribuyendo de esta manera al acercamiento de dos dominios GGDEF, requisito necesario para la catálisis²⁰¹ Por otra parte, como se describió anteriormente, la DGC Lcd1 de *Leptospira* es capaz de unir AMPc a través de su dominio GAF, y la unión de este ligando produce un aumento significativo en la actividad catalítica de la proteína¹⁵⁷. Por lo tanto, la presencia de un dominio GAF en BP1492 abre la posibilidad de que la actividad DGC de esta proteína sea dependiente de la unión de uno o más ligandos. A pesar de que los dominios GAF de diferentes especies suelen presentar una estructura tridimensional similar, las moléculas que unen varían ampliamente. Esto dificulta la identificación del ligando específico de cada dominio GAF basándose en el alineamiento de secuencias o la comparación de estructuras. Por este motivo, la ausencia de conservación de los residuos importantes para la unión a cAMP en Lcd1 en el GAF de BP1492, no permite descartar por completo que este último pueda unir efectivamente ese ligando. Por otra parte, se sabe que en general los ligandos reportados para cada dominio GAF se encuentran estrechamente relacionados con la vía de señalización reguladas por los mismos. Este es el caso, por ejemplo, de la proteína DcpA de *M. smegmatis*, una proteína GAF-GGDEF-EAL cuya expresión se ve inducida en condiciones de escasez de nutrientes, por lo que se propuso que podría estar involucrada en el metabolismo energético. Esto llevó a proponer una serie de ligandos que podrían ser sensados por

el dominio GAF, lo que culminó con la identificación de GDP como el ligando específico de esta proteína¹²⁶. Considerando estos antecedentes, es probable que la determinación de el o los procesos celulares en los cuales participa BP1492 provea indicios acerca de los ligandos que podrían regular la actividad de la proteína. De esta manera, la actividad catalítica estaría regulada según los requerimientos de la bacteria en distintas condiciones metabólicas y/o del entorno.

En cuanto al dominio GGDEF, la comparación con PleD permitió demostrar que BP1492 presenta conservados todos los aminoácidos que han sido descritos para la coordinación del sustrato, cofactores y la catálisis, lo que constituye un fuerte indicio de que la proteína podría presentar efectivamente actividad catalítica¹⁰⁷.

A través del modelado con AlphaFold2, se generaron predicciones de la estructura tridimensional de BP1492 y su dímero correspondiente. El modelo de dimerización explica con buena confiabilidad la formación del sitio catalítico de la proteína.

El gen *bp1492* presenta la particularidad de ser la única secuencia codificante para una DGC que es exclusiva de *B. pertussis* si se la compara con *B. bronchiseptica*. Varios autores han propuesto que *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* derivan filogenéticamente de un ancestro común, y la evolución del genoma de la primera se habría dado principalmente por eventos de pérdidas de material genético¹⁹⁸. Esto podría explicar por qué varias de las proteínas relacionadas a c-di-GMP en *B. bronchiseptica* no se encuentran en el genoma de *B. pertussis*, y esto podría estar relacionado con la diferencia en el rango de hospedador que presentan estas especies. En este contexto, la exclusividad de *bp1492* resulta interesante desde el punto de vista evolutivo. El hecho de que este gen presente un %GC significativamente distinto al promedio del genoma de *B. pertussis*, es un fuerte indicio de que pudo haber sido incorporado en un evento de transferencia de material genético desde otro organismo.

Por otra parte, los reportes de expresión *in vivo* de BP1492, sumado a la conservación del gen *bp1492* en la población circulante de *B. pertussis*, nos induce a pensar que esta proteína podría tener un rol importante para la patogénesis de la bacteria.

En conclusión, el análisis de BP1492 a través de diversas herramientas computacionales sugiere que se trata de una proteína citoplasmática con actividad catalítica que podría estar involucrada en alguna etapa del proceso de infección de *B. pertussis*. Además, es probable que su actividad esté regulada por la unión de uno o más ligandos en el dominio GAF N-terminal.

Capítulo III: Evaluación de la actividad DGC de BP1492

Introducción

Como se analizó anteriormente, la proteína BP1492 presenta conservados todos los aminoácidos que han sido descritos como importantes para la actividad DGC. La conservación de los aminoácidos GG(D/E)EF en el sitio activo de la proteína es un buen indicio de que la misma podría tener efectivamente actividad catalítica y por lo tanto ser capaz de sintetizar el segundo mensajero c-di-GMP. Sin embargo, se han reportado ejemplos de proteínas de esta familia que, a pesar de poseer un motivo catalítico conservado, no presentaron actividad experimentalmente detectable²⁰².

Con base en lo expuesto en el párrafo anterior, nuestra hipótesis es que BP1492 es una DGC activa. Como se describió en la introducción general, uno de los procesos más estudiados en relación a su dependencia con los niveles intracelulares de c-di-GMP es la transición entre vida planctónica y sésil, donde un aumento de c-di-GMP en la célula induce la adhesión a superficies y formación de *biofilm*, a la vez que reprime la movilidad bacteriana. Basados en este conocimiento previo, exploramos diversos sistemas alternativos que nos permitieran evidenciar experimentalmente que BP1492 posee actividad DGC.

Formación de *biofilm* en *Pseudomonas fluorescens* Δ 4DGC

P. fluorescens es una bacteria fitopatogena capaz de formar *biofilm* tanto en superficies bióticas como abióticas, fenotipo que se encuentra regulado por c-di-GMP. Newell y colaboradores realizaron un estudio exhaustivo y lograron asociar la actividad de cuatro DGC con la regulación de la formación de *biofilm* en *P. fluorescens*. Una cepa modificada en la cual se delecionaron del genoma los genes correspondientes a esas cuatro proteínas (*Pf* Δ 4DGC) mostró una baja formación de *biofilm*¹⁷³. Sin embargo, si se complementa a *Pf* Δ 4DGC con una DGC activa, el aumento de c-di-GMP intracelular restaura la capacidad formadora de *biofilm* de esta bacteria, por lo que en nuestro laboratorio hemos utilizado este sistema como método de *screening* de proteínas productoras de c-di-GMP⁸⁵.

Con el objetivo de evaluar si BP1492 es una DGC activa, se clonó el gen *bp1492* en el plásmido pMQ72, un plásmido replicativo en *P. fluorescens* que permite la expresión inducible por arabinosa, y se ensayó la capacidad de formar *biofilm* en placas de PVC. En este experimento se utilizó como control negativo la cepa *Pf* Δ 4DGC-pV, que porta el plásmido pMQ72 sin inserto, y como control positivo la cepa *Pf* Δ 4DGC-pgcbC, la cual expresa una de las cuatro DGC importantes para la formación de *biofilm* y presenta un aumento significativo en dicho fenotipo¹⁷³.

Como se observa en la Figura 3.1 y en concordancia con resultados previos, la cepa transformada con el plásmido vacío fue incapaz de formar *biofilm*, mientras que la cepa sobreexpresando el gen *gcbC* presentó una marcada inducción. Por su parte, la cepa que expresa la proteína BP1492 no presentó cambios en la capacidad formadora de *biofilm* comparada con la cepa que porta el plásmido vacío. Esto indica que, al menos en estas condiciones, BP1492 no fue capaz de aumentar los niveles de c-di-GMP de manera de impactar en la formación de *biofilm* de *Pf*Δ4DGC.

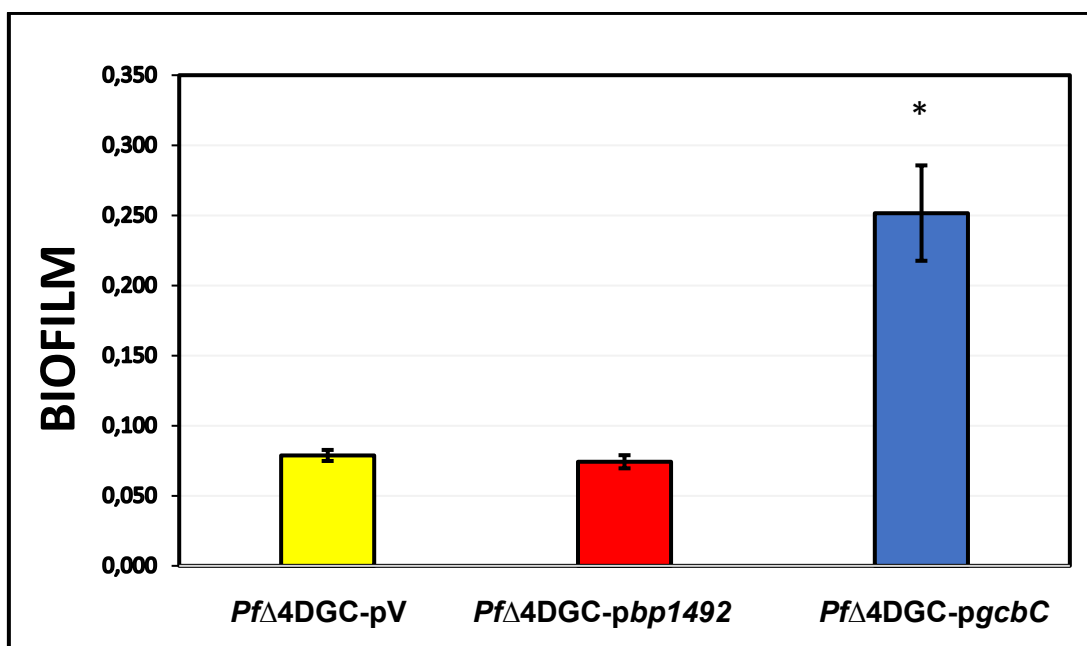


Figura 3.1. Formación de *biofilm* en *Pf*Δ4DGC. Las distintas cepas fueron incubadas en microplacas de PVC por 6 horas en medio K10T-1. En el gráfico se muestra el promedio de tres experimentos independientes, donde cada uno de ellos contó con 4 réplicas técnicas de cada cepa. La formación de *biofilm* fue cuantificada por tinción con cristal violeta. (*) indica diferencia estadísticamente significativa con $p < 0,05$ (Prueba t de Student).

Movilidad en *Escherichia coli* S17-1

La inhibición de la movilidad tipo *swimming* de las bacterias por aumento de los niveles de c-di-GMP es un fenotipo ampliamente descrito en una variedad de especies, incluida *E. coli*²⁰³. Con base en este conocimiento, se realizaron ensayos de movilidad tipo *swimming* en agar blando con la cepa de laboratorio *E. coli* S17-1, con la hipótesis de que un aumento en los niveles intracelulares de c-di-GMP inducido por BP1492 produciría una inhibición en la movilidad. Un ensayo similar fue utilizado para evaluar la actividad de la DGC AdrA de *P. aeruginosa*, cuya expresión ectópica en *E. coli* DH5α produjo una disminución de aproximadamente un 60% en la movilidad²⁰⁴.

En primer lugar, se pudo observar que la cepa salvaje transformada con el plásmido vacío (S17-1 pMQ72) presentó movilidad tipo *swimming* tras una incubación de 24 horas. Por su parte, una cepa expresando la proteína BP1492 (S17-1 pMQ72-*bp1492*) también presentó movilidad en esas condiciones, pero con una reducción de aproximadamente un 20% con respecto al control, lo que sugiere que en estas condiciones BP1492 podría estar actuando como DGC y aumentando los niveles de c-di-GMP intracelular (Fig. 3.2).

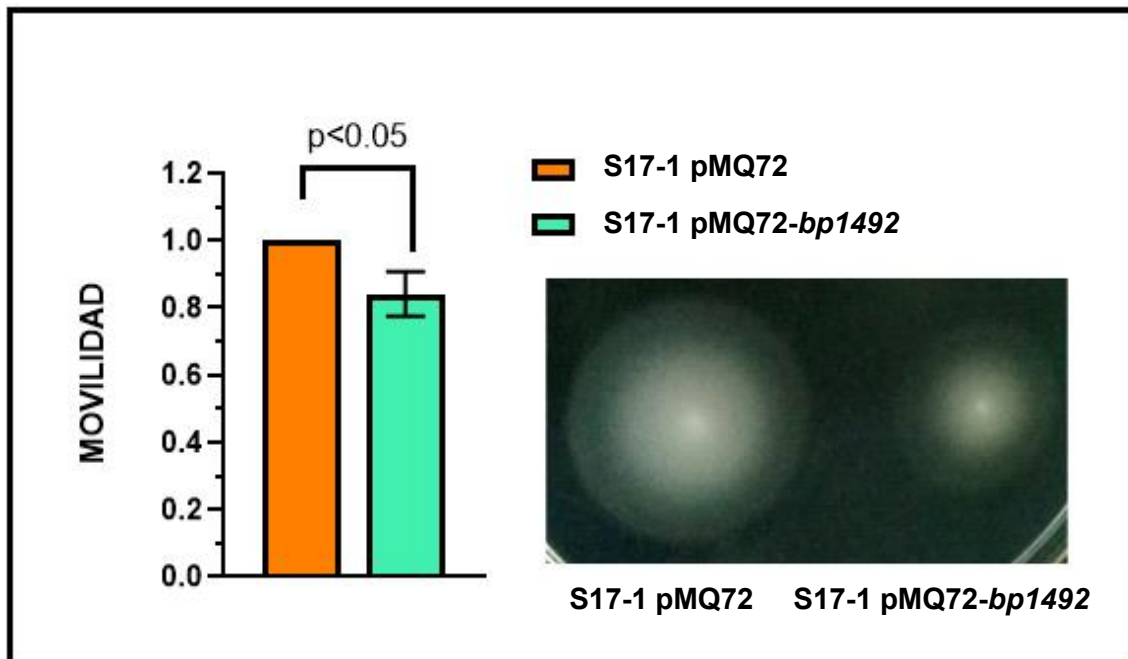


Figura 3.2. Movilidad en *E. coli* S17-1. Colonias aisladas de cada cepa fueron inoculadas en una placa de LB con 0,3% p/v de agar. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. El gráfico muestra el promedio de 3 experimentos independientes. En cada uno de ellos, se calculó la movilidad de la cepa S17-1 pMQ72-*bp1492* relativa a la cepa que porta el plásmido vacío. A la derecha del gráfico se muestra una imagen representativa tomada de una de las placas de movilidad. Estadística: $p < 0,05$ (Prueba t de Student).

Evaluación de la actividad DGC en *Bordetella*

Los sistemas mencionados anteriormente implican la expresión heteróloga de *bp1492* en bacterias que no forman parte del género *Bordetella*. A pesar de que el control de la transición entre vida planctónica y sésil por c-di-GMP es un proceso muy extendido en bacterias, las vías de señalización y los efectores moleculares involucrados pueden variar entre distintos organismos. Esto implica que las condiciones a las que se ve expuesta BP1492 en un entorno heterólogo posiblemente difieran de las que enfrenta en su entorno natural, lo que podría impactar en la regulación de la actividad catalítica de la proteína. Además, es probable que en un escenario de este tipo se produzca la

falta de algún factor específico involucrado en la respuesta a los cambios locales de c-di-GMP mediados por BP1492, lo que también podría afectar la posibilidad de evidenciar su actividad. Por estos motivos es que la evaluación de la actividad DGC de BP1492 en el género *Bordetella* representa un escenario más cercano al natural y decidimos avanzar en ese sentido para continuar con la caracterización. En las secciones subsiguientes, se describen experimentos llevados a cabo con el objetivo de evidenciar la actividad DGC de BP1492 en *B. bronchiseptica* y *B. pertussis*. Para la sobreexpresión de *bp1492* en estas especies, se realizó el subclonado del marco de lectura desde el plásmido donde se clonó originalmente (pMQ72) al plásmido pBBR1-MCS5-*nptII*. Este último posee un origen de replicación funcional en el género, y además permite la expresión constitutiva de la proteína de interés bajo control del promotor *nptII*.

Movilidad en *B. bronchiseptica*

En nuestro laboratorio hemos demostrado que c-di-GMP regula la movilidad tipo *swimming* en *B. bronchiseptica*. Ante un aumento de los niveles intracelulares del segundo mensajero producido por la sobreexpresión de una DGC se produce la inhibición de este fenotipo^{85,90}. *B. bronchiseptica* presenta movilidad únicamente en fase avirulenta, debido a que los genes necesarios para la síntesis del flagelo se producen cuando el sistema BvgAS se encuentra inactivo²⁰⁵. Por lo tanto, los ensayos de movilidad tipo *swimming* deben realizarse en condiciones que induzcan dicha fase fenotípica de *B. bronchiseptica*, lo que se logra suplementando las placas de agar SS blando con 40 mM de MgSO₄.

Con el objetivo de comprobar si BP1492 posee actividad DGC, se realizó su sobreexpresión en *B. bronchiseptica* y se ensayó la movilidad en agar blando.

En concordancia con resultados obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio, la cepa salvaje que porta el vector sin inserto (Bb-pV) presentó movilidad en las condiciones ensayadas. Tal como se había observado previamente, la sobreexpresión de la DGC BdcB produjo una inhibición total de la movilidad (Tesis K. Belhart; 2022). Por su parte, la sobreexpresión de *bp1492* no produjo cambios en la movilidad con respecto a la cepa salvaje (Figura 3.3).

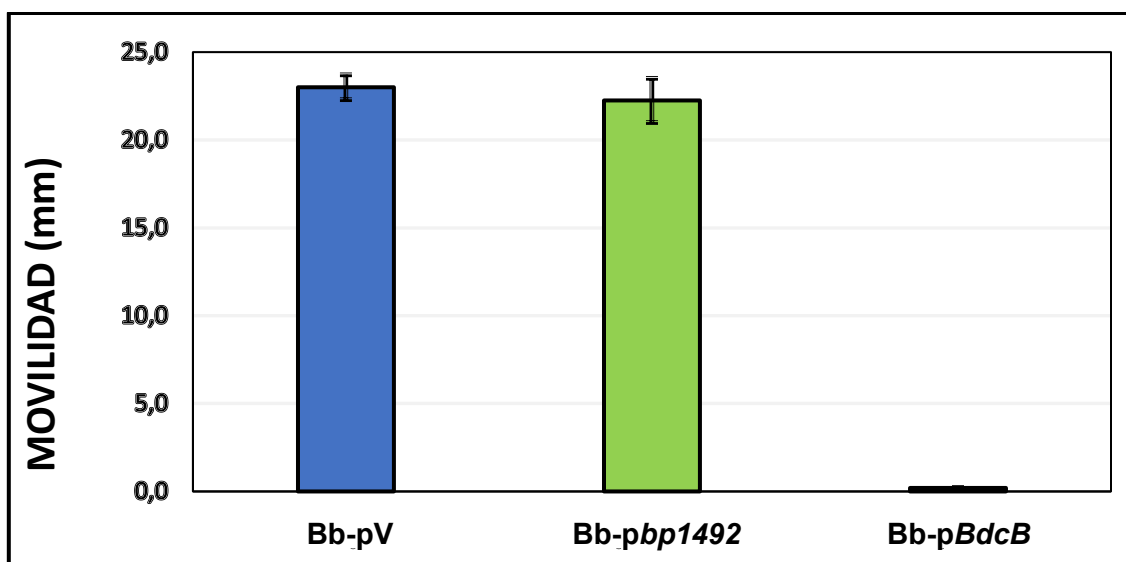


Figura 3.3. Movilidad en *B. bronchiseptica*. Colonias aisladas de cada una de las cepas fueron inoculadas por punción en una placa de SS (agar 0,3% p/v) suplementada con MgSO₄ 40 mM y Gentamicina 50 µg/ml, tras lo cual se incubaron por 18 horas a 37°C y se midieron los halos de movilidad obtenidos. En el gráfico se muestra el promedio de 3 experimentos independientes.

Formación de *biofilm* en *B. bronchiseptica*

En nuestro laboratorio hemos descrito que un aumento en los niveles intracelulares de c-di-GMP causados por la sobreexpresión de una DGC en *B. bronchiseptica* se traduce en una mayor capacidad de la bacteria para formar *biofilm*^{85,90}. Por lo tanto, nos propusimos utilizar esta estrategia para analizar si BP1492 posee actividad DGC.

Como se describió en la introducción, la regulación de los factores de virulencia en las bacterias de este género está regulada principalmente por el sistema de dos componentes BvgAS, lo que define distintas fases fenotípicas con perfiles de expresión diferenciales. En las condiciones estándar de cultivo de *B. bronchiseptica* (Medio SS, 37°C), la bacteria se encuentra en fase virulenta. El agregado al medio de cultivo de ácido nicotínico (AN) o sulfato de magnesio (MgSO₄) inducen la fase de virulencia intermedia o de avirulencia, según la concentración en que se encuentren presentes.

En nuestro laboratorio, hemos observado que el aumento de la formación de *biofilm* inducido por la sobreexpresión de una DGC no necesariamente se evidencia siempre en la misma fase fenotípica. Por ejemplo, la sobreexpresión de *bdcG* induce un aumento en la formación de *biofilm* únicamente en la condición SS + 0,5 mM AN, mientras que la sobreexpresión de *bdcA* induce un aumento en concentraciones de AN de 0,5 y 1,0 mM^{85,90}.

Teniendo en cuenta lo expuesto en los párrafos anteriores, se evaluó la formación de *biofilm* en placas de PVC de la cepa de *B. bronchiseptica* sobreexpresando *bp1492* en distintas concentraciones de ácido nicotínico (0; 0,5; 1,0 y 2,0 mM). Como control del

experimento se evaluó la capacidad de formar *biofilm* de la cepa salvaje en las mismas condiciones. Además, se utilizó como control positivo la sobreexpresión de *bdcB*, ya caracterizada en nuestro laboratorio como una DGC activa.

En concordancia con resultados previos, la sobreexpresión de *bdcB* indujo un aumento en la formación de *biofilm* en todas las condiciones ensayadas. Por su parte, la cepa que sobreexpresa *bp1492* presentó un aumento significativo del 30% en la condición de 1,0 mM de AN (Figura 3.4).

Este resultado indica que BP1492 es una DGC activa capaz de regular la formación de *biofilm* en *B. bronchiseptica*.

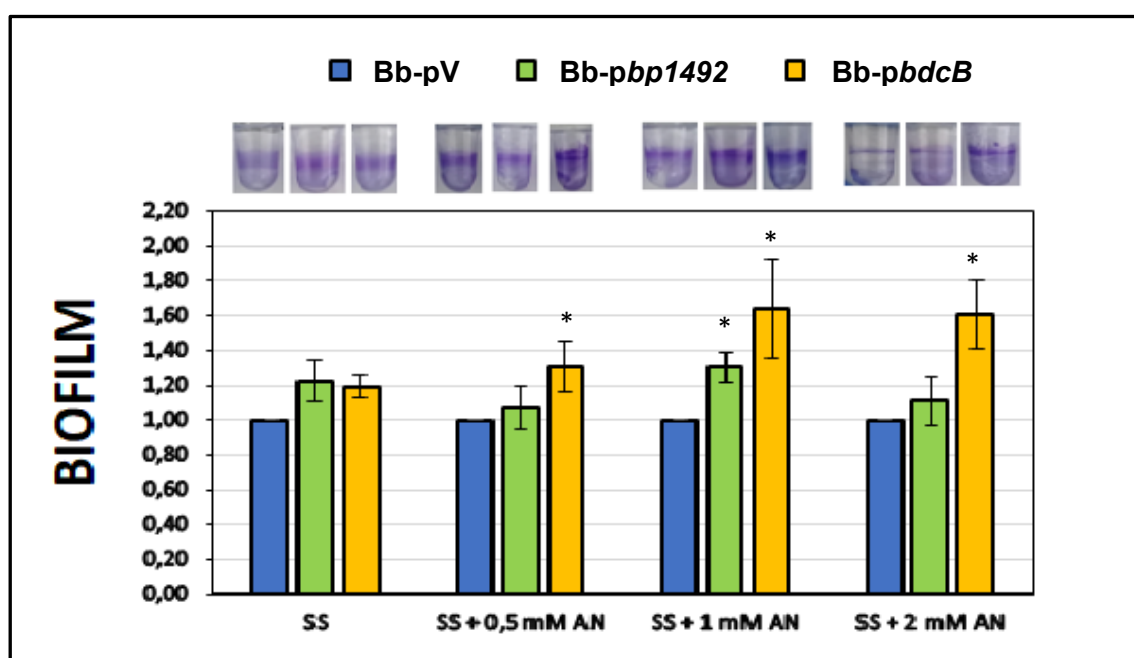


Figura 3.4. Efecto de la sobreexpresión de *bp1492* en *B. bronchiseptica*. El gráfico muestra el promedio de tres experimentos independientes. En cada uno de ellos, la formación de *biofilm* para cada cepa en una dada condición, fue expresada de forma relativa al valor obtenido para la cepa salvaje en esa misma condición. (*) indica diferencia estadísticamente significativa respecto a Bb pV, con $p < 0,05$ (Prueba t de Student).

Formación de *biofilm* en *B. pertussis*

El resultado descrito en la sección anterior demuestra que BP1492 es capaz de aumentar la formación de *biofilm in vitro* en un miembro del género *Bordetella*. Con el objetivo de evaluar el rol de la proteína en su entorno natural, se realizó la sobreexpresión del gen correspondiente en la cepa BPSM. La misma es una cepa derivada de la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I, con la única diferencia de ser resistente a estreptomycin²⁰⁶ y cuya capacidad de formar *biofilm* en superficies abióticas ya ha sido demostrada^{207,208}. Considerando los resultados obtenidos en *B. bronchiseptica*, es probable que la capacidad de *bp1492* de inducir un aumento en la

formación de *biofilm* en *B. pertussis* depende de la fase de virulencia en la cual se encuentre la bacteria. Es por eso que se realizó el ensayo en 3 condiciones distintas: medio SS común, SS suplementado con AN 0,5 mM, SS suplementado con AN 1,0 mM y SS suplementado con 2,0 mM, con el objetivo de emular las distintas fases de virulencia de la bacteria.

Las cepas utilizadas en este ensayo se construyeron introduciendo por conjugación en la cepa BPSM los plásmidos pBBR1MCS-5-nptII (BPSM pV) y pBBR1MCS-5-nptII-*bp1492* (BPSM-*pbp1492*).

Para evaluar la formación de *biofilm in vitro*, se prepararon suspensiones bacterianas de $DO_{650nm}=0,2$, se inocularon en una placa multipocillos y se incubaron durante 72 horas a 37°C, tras lo cual se cuantificó mediante la técnica de cristal violeta. En concordancia con reportes previos, la cepa BPSM que porta el vector vacío fue capaz de formar *biofilm*. Por su parte, la sobreexpresión de *bp1492* no produjo una modificación significativa en la capacidad formadora de *biofilm* de la bacteria en ninguna de las condiciones ensayadas (Figura 3.5).

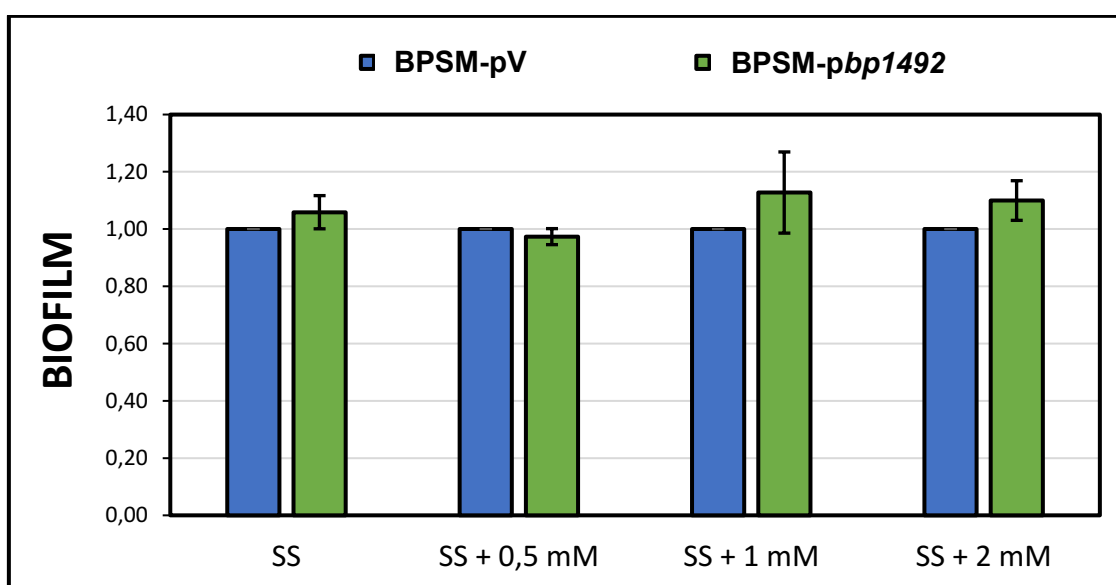


Figura 3.5. Efecto de la sobreexpresión de *bp1492* en la formación de *biofilm* de *B. pertussis*. Las bacterias fueron inoculadas en placas multipocillos con una $DO_i=0,2$ e incubadas durante 72 horas a 37°C. La formación de *biofilm* se determinó mediante la técnica de cristal violeta. El gráfico muestra el promedio de tres experimentos independientes. En cada uno de ellos, la formación de *biofilm* para cada cepa en una dada condición, fue expresada de forma relativa al valor obtenido para la cepa salvaje en esa misma condición.

Regulación de la actividad DGC de BP1492

Como se mencionó anteriormente en la introducción general, la actividad de las DGC se encuentra regulada para garantizar que sólo se expresen, o solo presenten actividad catalítica en una condición o condiciones particulares. A pesar de haber evaluado la actividad de BP1492 en diversos sistemas experimentales, sólo pudo evidenciarse claramente en la movilidad de *E. coli* y en la formación de *biofilm* en *B. bronchiseptica*. En consecuencia, hipotetizamos que la falta de actividad de la proteína en la mayoría de los escenarios evaluados podría deberse a que las condiciones necesarias para inducir la actividad catalítica no se encuentren presentes.

En las secciones subsiguientes se describen experimentos apuntados a identificar y explicar el o los mecanismos que podrían controlar el funcionamiento de BP1492.

Construcción y evaluación de una variante de BP1492 constitutivamente activa

Como se mencionó anteriormente, los dominios GAF se encuentran asociados en general al sensado de pequeños ligandos, que pueden ir desde moléculas pequeñas como metales y cationes divalentes hasta nucleótidos y azúcares²⁰⁹. Trabajos donde se estudiaron dominios de esta familia, apoyan la hipótesis de que una de sus funciones sería controlar el estado oligomérico de las proteínas que componen. Esta característica sería importante en las DGC, donde la dimerización de los dominios GGDEF es requisito fundamental para la actividad catalítica de estas proteínas^{157,210}.

El hecho de que la estructura de dominios predicha para BP1492 sea GAF-GGDEF nos induce a pensar que el dominio accesorio puede tener algún rol en la regulación del estado oligomérico de la proteína, lo que implicaría que la capacidad de la misma de sintetizar c-di-GMP estaría directamente relacionada con la estructura cuaternaria controlada por interacciones homodiméricas entre dominios GAF de distintos monómeros de BP1492. Posiblemente dichas interacciones se vean afectadas por la unión de uno o varios ligandos específicos en el dominio accesorio.

Ante la dificultad de obtener una predicción confiable acerca de la identidad de el o los ligandos que podrían ser sensados por el dominio GAF de BP1492, nos propusimos simular experimentalmente una condición en la cual se vea favorecida la dimerización, con la hipótesis de que en esas condiciones la proteína BP1492 presentará una capacidad aumentada de síntesis de c-di-GMP. Una estrategia similar ya fue utilizada para la caracterización de WspR, una DGC de *P. aeruginosa*. En dicho trabajo, se reemplazó el dominio REC de la proteína WspR por el motivo estructural cremallera de leucinas del factor de transcripción GCN4 de levadura¹³². La cremallera de leucinas es

un motivo estructural de proteínas que sirve como un potente módulo de dimerización. Estudios de cristalización y funcionales demostraron que el motivo cremallera de leucina es suficiente para la dimerización de la proteína y que la misma se da a causa de la formación de varias estructuras *coiled coil* paralelas²¹¹. La proteína de fusión GCN4-GGDEF (WspR) mostró un aumento en la capacidad de sintetizar c-di-GMP y una independencia funcional con las condiciones del entorno. Además, la misma fue cristalizada y se pudo observar que efectivamente la presencia del dominio GCN4 induce la oligomerización de los dominios GGDEF, explicando su hiperactividad. Para evaluar el impacto de la dimerización en la actividad y la regulación de BP1492, se construyó una proteína de fusión en la cual reemplazamos el dominio GAF de BP1492 por el motivo estructural cremallera de leucinas de GCN4 (Zip), manteniendo intacta la región C-terminal de la misma. A esta proteína de fusión la nombramos Z-1492 (Figura 3.6). La secuencia de nucleótidos correspondiente al motivo estructural cremallera de leucinas fue amplificada por PCR usando como molde el plásmido pKT25-zip.

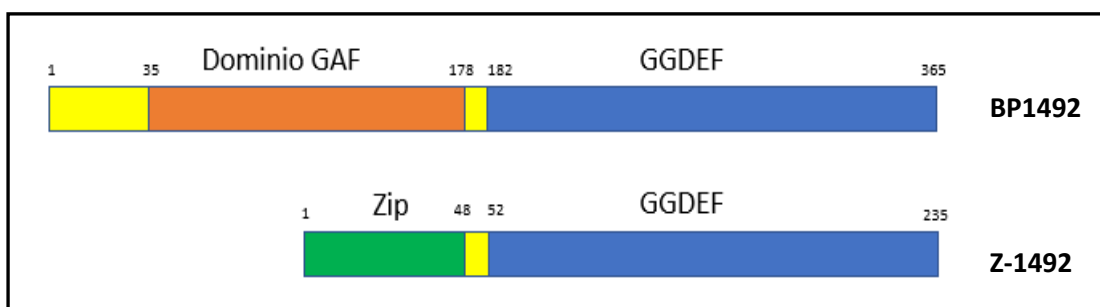
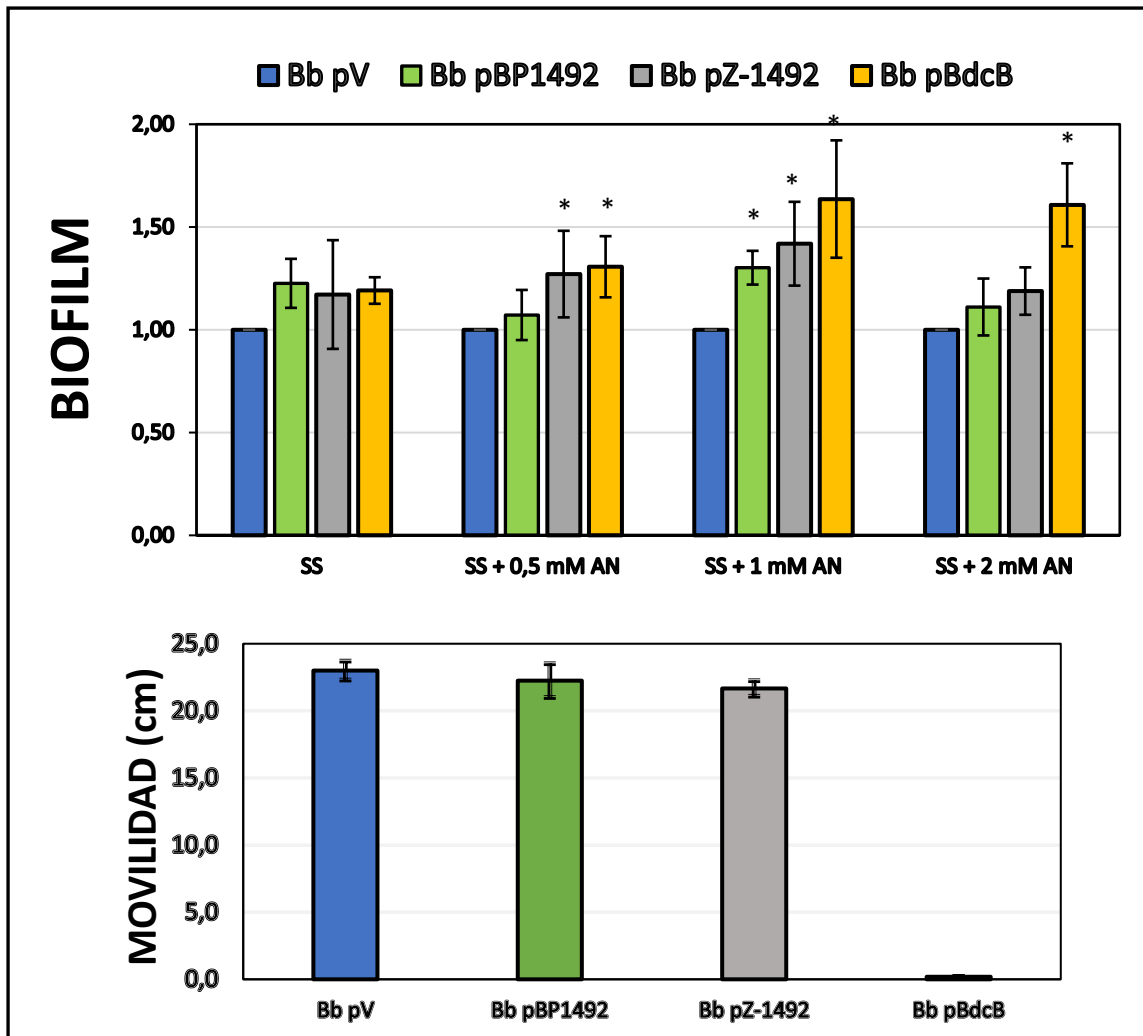


Figura 3.6. Reemplazo del dominio N-terminal de BP1492 por un motivo de dimerización. **a)** Representación esquemática de la estructura de dominios de BP1492 salvaje y su derivada Z-1492.

Nuestra hipótesis es que la presencia en el N-terminal de un motivo estructural con tendencia elevada a dimerizar, favorecería la dimerización de los dominios GGDEF presentes en el C-terminal, aumentando la actividad catalítica de la proteína.

Para evaluar esta hipótesis, se volvieron a realizar los ensayos de formación de *biofilm* y movilidad en *B. bronchiseptica*. Como se observa en la figura 3.7.a, la cepa que sobreexpresa Z-1492 presentó una formación de biofilm mayor respecto a la cepa salvaje, no sólo a 1,0 mM de AN sino también a 0,5 mM. Por otro lado, la sobreexpresión de Z-1492 no produjo cambios en la movilidad tipo *swimming* de *B. bronchiseptica*, al igual que lo observado anteriormente al sobreexpresar la proteína salvaje (Fig. 3.7.b).



La conclusión de esta serie de experimentos es que el cambio del dominio accesorio GAF de BP1492 por el motivo cremallera de leucinas generó una proteína que retiene la actividad DGC, ya que es capaz de inducir un aumento en la formación de *biofilm* en *B. bronchiseptica* en las condiciones de 0,5 mM y 1,0 mM de AN. Esto representa una diferencia respecto a la proteína salvaje, que sólo pudo inducir un aumento de formación de *biofilm* a concentración de AN 1,0 mM, lo que sugiere que Z-1492 podría presentar una mayor actividad, esperable debido a la alta afinidad de los dominios Zip entre sí. En conclusión, podríamos proponer que la actividad de BP1492 estaría regulada por su dimerización y a su vez la dimerización por el dominio GAF. La unión de posibles

ligandos a este dominio podría regular la intensidad de dimerización y en consecuencia la actividad DGC de BP1492.

Evaluación de la regulación de la actividad de BP1492 por AMPc

En un trabajo publicado en 2017, se describió la DGC de *L. interrogans* Lcd1, que presenta estructura de dominios GAF-GGDEF, la misma que se predice para BP1492. En dicho trabajo se demostró que el dominio GAF de la proteína une el nucleótido AMPc, lo que genera una modificación en la estructura y promueve la actividad¹⁵⁷.

Si bien los residuos importantes para la unión de AMPc en Lcd1 no se encuentran conservados en BP1492 (Capítulo II), nos propusimos evaluar experimentalmente si su actividad podría verse modificada con la unión de dicho nucleótido. Para ello, se utilizó la cepa de *P. aeruginosa* PA14 dado que se encuentra descrito que puede inducirse un aumento en los niveles de AMPc artificialmente. Esto se logra mediante la depleción del calcio intracelular por el agregado de un agente quelante como EGTA^{212,213}.

Al igual que lo ya mencionado para una gran variedad de bacterias, la sobreexpresión de una DGC activa en *P. aeruginosa* induce un aumento en la capacidad de formar *biofilm*²¹⁴. Por lo tanto, nuestra hipótesis fue que la sobreexpresión de *bp1492* en este sistema podría producir un efecto de este tipo, y que el mismo podría verse inducido a través de la generación artificial de niveles elevados de AMPc en la bacteria. Para evaluarlo, se introdujo el plásmido pMQ72-*bp1492* en *P. aeruginosa* PA14 por electroporación, y se realizó un ensayo de formación de *biofilm in vitro* en medio LB estándar. Se utilizaron como controles la cepa PA14-pV, que porta el vector pMQ72 sin inserto, y la cepa PA14-*yfiN*, que sobreexpresa una DGC propia de *P. aeruginosa* PA14 con actividad DGC ya demostrada^{214,215}.

En nuestras manos, en concordancia con resultados previos, la sobreexpresión de *yfiN* indujo un aumento en la formación de *biofilm* de aproximadamente un 200% en términos absolutos con respecto a la cepa que porta el vector sin inserto. Por su parte, la sobreexpresión de *bp1492* en estas condiciones no produjo cambios en la capacidad de la bacteria de formar *biofilm* (Figura 3.8).

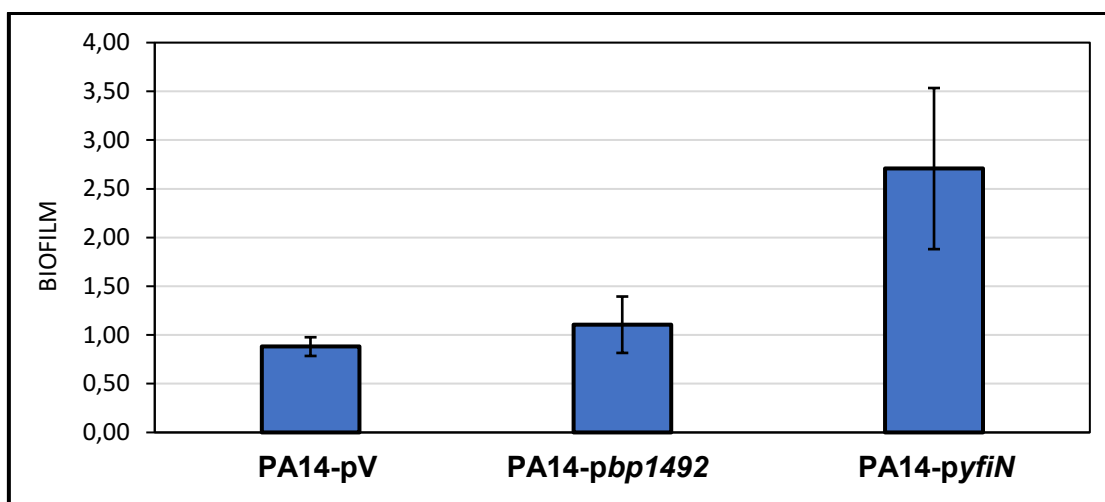


Figura 3.8. Efecto de la sobreexpresión de *bp1492* en la formación de *biofilm* de *P. aeruginosa* PA14. Las distintas cepas fueron incubadas en LB estándar durante 24 horas en placas multipocillos, tras lo cual se cuantificó la formación de *biofilm* por la técnica de cristal violeta. En el gráfico se muestra el promedio de tres experimentos independientes.

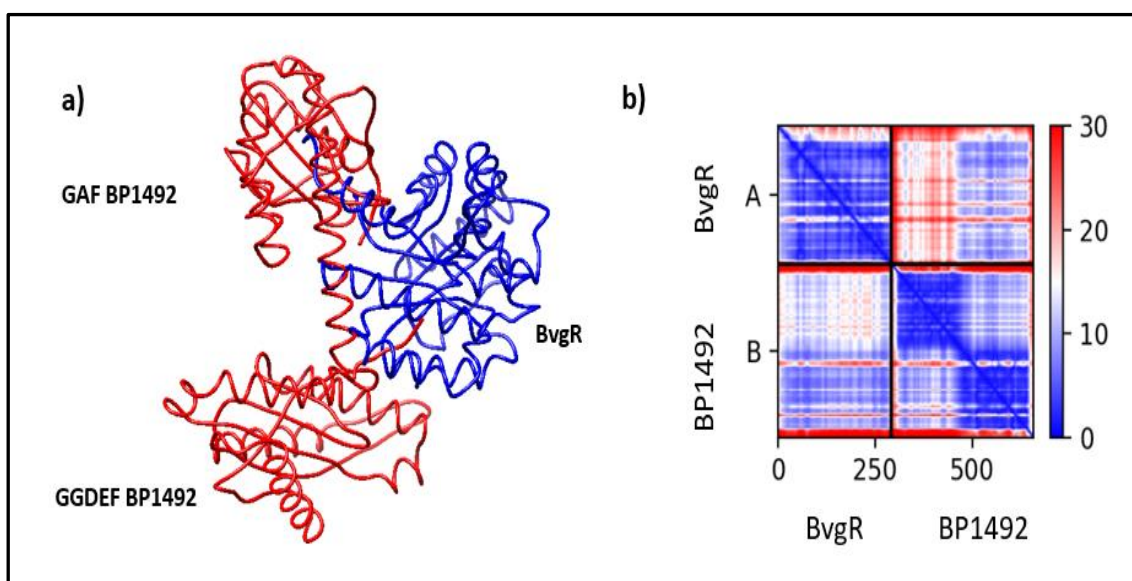
A continuación, intentamos emular las condiciones experimentales en las cuales se ha reportado que se produce un aumento en la concentración de AMPc intracelular en *P. aeruginosa*. En el trabajo realizado por Jin y colaboradores, se realizaron cultivos *overnight* de la cepa *P. aeruginosa* PAK, que luego fueron diluidos y vueltos a incubar hasta alcanzar una $DO_{600}=1$ en un medio conteniendo EGTA (5 mM). En estas condiciones, se triplicó el valor intracelular de AMPc²¹⁶.

En nuestro laboratorio no fuimos capaces de cultivar a PA14 con agregado de EGTA en el cultivo, ya que no se obtuvo crecimiento luego del paso de dilución y cambio de medio. Por otro lado, también se intentó adicionar el EGTA para inducir la depleción de calcio y el consecuente aumento de AMPc directamente en la placa multipocillos donde se incubaron las bacterias para el ensayo de formación de *biofilm*. Sin embargo, al cuantificar la formación de *biofilm* de las distintas cepas en medio LB con el agregado de 0,5, 1,0 o 2,0 mM de EGTA, se obtuvo en todos los casos una adhesión mínima o nula en comparación con lo obtenido en medio LB estándar, lo que sugiere que podría estar ejerciendo un efecto tóxico sobre las bacterias. Debido a estos problemas experimentales, nos vimos impedidos de avanzar en el estudio de la regulación de la actividad DGC de BP1492 por AMPc.

Participación de BvgR en la regulación de la actividad de BP1492

El programa AlphaFold2 permite predecir posibles interacciones entre proteínas¹⁹⁶. Cargando la secuencia del posible heterodímero como una sola proteína el programa modela la estructura de ambos y predice un algoritmo de posibilidad de posición relativa

para todos los aminoácidos. Teniendo en cuenta que la interacción entre DGC y PDE se ha observado en diferentes sistemas, se evaluó si BP1492 era capaz de interactuar con la única proteína con un solo dominio EAL presente en *B. pertussis*, BvgR. Para ello, se generó un archivo FASTA en el cual se concatenaron ambas secuencias y se introdujeron en el programa para su evaluación. El resultado consta de una estructura tridimensional del posible heterodímero (Figura 3.9.a), y un gráfico bidimensional que representa la confiabilidad de la predicción (Figura 3.9.b). Este último muestra el error esperado para cada posición de la secuencia, en donde las posiciones con mayor error se grafican con un punto rojo y las de menor error con un punto azul. El análisis de este gráfico muestra que la predicción de la posible interacción entre BvgR y BP1492 es confiable, ya que se obtienen mayormente posiciones con bajo error asociado (cuadrante inferior izquierdo y cuadrante superior derecho en la Figura 3.9.b). Como conclusión, el programa predice con buena probabilidad una posible interacción entre ambas proteínas.



Evaluación del rol de BvgR en la actividad DGC de BP1492

Con base en la posible interacción entre BP1492 y BvgR predicha *in silico*, nos propusimos evaluar si BvgR es necesaria para la actividad DGC de BP1492. Para ello, decidimos utilizar el sistema experimental donde esta actividad pudo ser evidenciada de forma más contundente. Como se mostró anteriormente en este capítulo, la sobreexpresión de *bp1492* en *B. bronchiseptica* induce un aumento en la formación de

biofilm en la condición de cultivo con 1,0 mM de AN (fase intermedia). A partir del inicio de que podría existir una interacción física entre BP1492 y BvgR, razonamos que es posible que BP1492 necesite a BvgR para ejercer su efecto. Para comprobar esta hipótesis, se realizó el ensayo de formación de *biofilm* en las condiciones mencionadas, sumando al análisis a una cepa de *B. bronchiseptica* mutante en BvgR sobreexpresando *bp1492* ($\Delta bvgR$ -*pbp1492*).

Como se puede observar en la Figura 3.10, la sobreexpresión de *bp1492* en *B. bronchiseptica* salvaje arrojó en esta serie de experimentos el mismo resultado que el ya discutido anteriormente, con un aumento en la formación de *biofilm* en 1,0 mM de AN. Por otro lado, cuando la sobreexpresión se realizó en el entorno mutante en *bvgR*, BP1492 fue incapaz de aumentar la formación de *biofilm*. Este resultado sugiere que podría haber una relación funcional entre BvgR y BP1492, donde la DGC necesitaría de la presencia de la proteína BvgR o algún factor cuya expresión dependa de la misma.

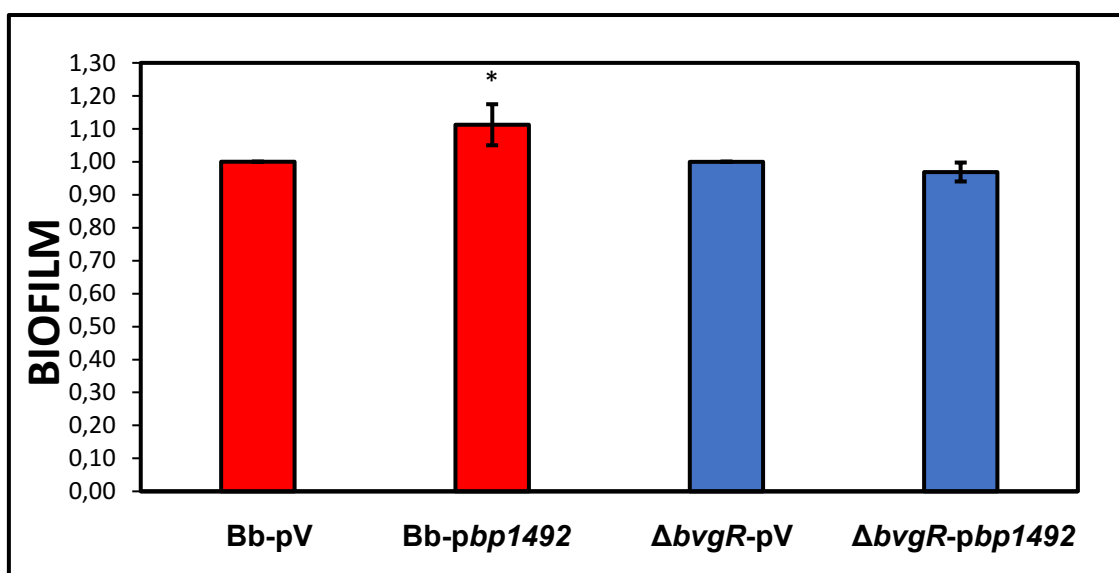


Figura 3.10. Sobreexpresión de *bp1492* en el mutante BvgR. Se evaluó la formación de *biofilm* en placas de PVC, en medio SS + 1mM de AN, con incubación de 24 horas a 37°C. La formación de *biofilm* fue cuantificada por tinción con cristal violeta. En el gráfico se muestra el promedio de tres experimentos independientes. En cada uno de ellos, el valor de A₅₉₅ fue expresado en forma relativa al valor de la cepa salvaje en el mismo entorno genético. (*) en la figura indica diferencia significativa respecto a la cepa Bb-pV, con $p < 0,05$ (prueba t de Student).

Conclusiones y discusión

Los resultados presentados en este capítulo demuestran que la sobreexpresión de *bp1492* es capaz de modificar fenotipos asociados a c-di-GMP, lo que sugiere que la proteína es capaz de aumentar los niveles intracelulares de este segundo mensajero. Resulta interesante remarcar que esto no pudo ser evidenciado en todos los sistemas

utilizados, lo cual podría sugerir que hay mecanismos regulatorios involucrados dependientes de las condiciones particulares de cada ensayo y/o relacionados a los distintos fenotipos estudiados.

La sobreexpresión de DGC en *P. fluorescens* Δ 4DGC es un método que hemos usado en nuestro laboratorio para evidenciar la actividad DGC de varias proteínas del género *Bordetella*. Sin embargo, cabe resaltar que no siempre es posible. Hemos observado casos de proteínas de *B. bronchiseptica* incapaces de aumentar la formación de *biofilm* de *P. fluorescens* Δ 4DGC, pero cuya actividad si pudo ser evidenciada por otros métodos (Tesis N. Ambrosis, 2018). Esto no resulta ilógico si se tienen en cuenta ciertos problemas que pueden aparecer al expresar proteínas en un sistema heterólogo, principalmente los asociados al correcto plegamiento de la proteína que podrían afectar la actividad enzimática y a la posible ausencia de proteínas efectoras que podrían ser necesarias para la respuesta a los cambios de c-di-GMP inducidos por BP1492.

La presencia del dominio GAF asociado al GGDEF en BP1492 sugiere una posible regulación de la actividad a través de la unión de ligandos, que podría ser positiva o negativa. Si bien no conocemos la identidad de esta/s molécula/s, cabe la posibilidad de que su disponibilidad sea distinta en la condición particular del ensayo de formación de *biofilm* en *P. fluorescens* Δ 4DGC, a la que se pudiera encontrar en *B. pertussis*, y por lo tanto no se produzca la activación o no se libere la represión de la actividad DGC de BP1492. Por otro lado, también es posible que BP1492 interactúe con una o varias proteínas de *B. pertussis* para controlar fenotipos asociados a c-di-GMP, la cual podría regular su actividad o responder a los cambios de c-di-GMP de manera local. En un sistema de expresión heteróloga es posible que dicho factor no se encuentre presente y por lo tanto no se pueda evidenciar la actividad de BP1492.

En cuanto a la movilidad en *E. coli*, observamos una disminución en este fenotipo en una cepa que sobreexpresa *bp1492* con respecto a la cepa salvaje, lo cual nos otorgó indicios de que la proteína podía ser capaz efectivamente de producir c-di-GMP. Sin embargo, también podría deberse a que la sobreproducción de una proteína genere algún defecto en la capacidad de moverse debido a un elevado consumo de energía dedicado a sintetizar la proteína heteróloga, aunque cabe destacar que las cepas no presentaron diferencias en el crecimiento en medio LB.

Con respecto al análisis de los fenotipos en *B. bronchiseptica*, se observó que la sobreexpresión de *bp1492* induce un aumento en la formación de *biofilm*, pero no provoca una inhibición de la movilidad. Este resultado puede parecer llamativo ya que sería esperable que si BP1492 es capaz de aumentar c-di-GMP también se evidenciara una diferencia en la movilidad. Sin embargo, en el estudio de BdcG, otra DGC de *B. bronchiseptica*, también se observó que su sobreexpresión modifica únicamente la

formación de *biofilm* sin afectar la movilidad (Tesis N. Ambrosis; 2018). Estos hallazgos pueden explicarse teniendo en cuenta que varios trabajos sugieren que la señalización por c-di-GMP ocurre a nivel local²¹⁷. En ese marco, es posible pensar en BP1492 actuando como productora de c-di-GMP en una ubicación particular en la célula y/o interaccionando con efectores involucrados específicamente en el control de la formación de *biofilm*. También es importante resaltar que las condiciones de cultivo en ambos ensayos no son exactamente las mismas. En los ensayos de movilidad las bacterias se cultivan con el agregado de concentraciones milimolares de MgSO₄, lo que induce una fase de avirulencia, mientras que en el ensayo de *biofilm* la diferencia se observa con AN 1,0 mM, lo que induce una fase intermedia. En consecuencia, es posible que si la actividad catalítica de BP1492 depende de alguna señal metabólica particular para su funcionamiento, la diferencia en las condiciones de cultivo se vea traducida en una diferente actividad de la proteína. La conclusión de esta serie de experimentos es que BP1492 efectivamente posee actividad DGC, ya que es capaz de aumentar la formación de *biofilm* de *B. bronchiseptica* e inhibir la movilidad de *E. coli*, ambos resultados concordantes con altas concentraciones de c-di-GMP.

Una observación que vale la pena realizar es que en la mayoría de los ensayos no fue posible evidenciar la actividad DGC de BP1492, y que en los casos donde sí se obtuvieron resultados positivos los mismos fueron sutiles. Este análisis surge de comparar los resultados obtenidos para BP1492 con los observados para otras DGC con las cuales hemos trabajado en nuestro laboratorio. Un ejemplo claro es del de BdcB, cuya sobreexpresión induce un aumento de la formación de *biofilm* en *P. fluorescens* Δ 4DGC, mientras que en *B. bronchiseptica* inhibe la movilidad y produce un fuerte aumento de la formación de *biofilm* (Tesis K. Belhart; 2022). Considerando que el dominio GGDEF de BP1492 presenta conservados los residuos importantes para la coordinación del sustrato y la catálisis, no es esperable que esta aparente baja actividad se deba a un defecto relacionado al mecanismo catalítico del dominio GGDEF, sino más bien a su regulación.

La presencia del dominio GAF en la región N-terminal de la proteína sugiere que puede existir una regulación de la actividad del dominio GGDEF a través del control de su estado oligomérico. El requisito de la dimerización de dos dominios GGDEF para poder llevar adelante la catálisis se encuentra ampliamente aceptado²¹⁸ y es probable que en algunas de las condiciones ensayadas la proteína se encuentre como monómero y por ese motivo no pueda ejercer su actividad. Sin embargo, el reemplazo del dominio GAF de BP1492 por el motivo cremallera de leucinas para generar una variante constitutivamente activa no produjo cambios importantes en la regulación de la actividad de la proteína, al menos en los fenotipos ensayados. Pudimos observar que Z-1492, a

diferencia de la enzima salvaje, fue capaz de inducir un aumento de biofilm cuando la concentración de ácido nicotínico en el medio fue de 0,5 mM. Esto indicaría que la actividad de BP1492 está regulada por su dimerización. Sin embargo, el reemplazo del dominio accesorio no modificó el comportamiento de la proteína en el ensayo de movilidad, donde hubiera sido esperable que se produzca una inhibición al menos parcial si es que la proteína Z-1492 presentara una actividad catalítica aumentada. Es importante recordar que tal como se mencionó más arriba, esto podría indicar que el mecanismo de acción de BP1492 se basa en la generación de aumentos locales de c-di-GMP, en el vecindario del efector.

Como se describió en la introducción, la interacción de proteínas GGDEF con proteínas EAL es un mecanismo presente en muchas bacterias que confiere especificidad a la señalización por c-di-GMP²¹⁹. A través del uso del programa AlphaFold2, se obtuvieron indicios de una posible interacción entre el dominio GGDEF de BP1492 y la proteína BvgR. La capacidad de BP1492 de aumentar la formación de *biofilm* en la condición de 1,0 mM de AN se vio impedida al realizar el experimento en un entorno donde BvgR no se encuentra presente, lo que apoya la idea de una relación funcional entre estas proteínas. Como se mencionó en la introducción general, BvgR es una proteína con dominio EAL que participa en la represión de la expresión de genes de avirulencia cuando el sistema BvgAS se encuentra activado. El mecanismo por el cual lleva a cabo esta función aún no ha sido demostrado experimentalmente. Algunos autores han propuesto que la regulación mediada por BvgR estaría relacionada con su capacidad de actuar como fosfodiesterasa, es decir, degradando c-di-GMP y por lo tanto impactando indirectamente en la expresión génica^{62,63}. Sin embargo, aún no se han reportado resultados experimentales que demuestren fehacientemente dicha hipótesis. Un análisis bioinformático del dominio EAL de BvgR sugiere que esa proteína no podría llevar a cabo la degradación de c-di-GMP, ya que no presenta conservados los residuos importantes para la catálisis²²⁰ (Tesis MP. Gutiérrez, 2021). El requerimiento de BvgR para que BP1492 pueda inducir un aumento en los niveles de c-di-GMP abre la posibilidad de que un mecanismo de acción de BvgR tenga que ver con su interacción con una o más DGC, permitiendo que se modifique la concentración del segundo mensajero en un tiempo y espacio determinados. En este escenario, la actividad DGC de BP1492 sólo ocurriría cuando esta se encontrase interaccionando con BvgR induciendo un cambio local en la concentración de c-di-GMP, que podría afectar en forma específica la actividad de uno o varios efectores involucrados en la regulación de la expresión de los genes de avirulencia por BvgR.

Capítulo IV: Rol de BP1492 en la regulación de procesos asociados a c-di- GMP

Introducción

Los resultados presentados en el capítulo anterior demuestran de forma indirecta que BP1492 es capaz de aumentar los niveles de c-di-GMP en condiciones particulares. Sin embargo, en el experimento de formación de *biofilm* en *B. pertussis*, único realizado en el entorno natural de la proteína, su sobreexpresión no produjo cambios. Con el fin de evaluar el rol de BP1492 en su entorno natural, se construyó una cepa mutante que no expresa la proteína. La misma se obtuvo interrumpiendo el marco de lectura de *bp1492* a través de la inserción por recombinación homóloga de un plásmido no replicativo en el género *Bordetella* (ver Materiales y métodos).

Como se mencionó anteriormente, el gen *bp1492* se ha observado regulado positivamente en el marco de infecciones *in vivo*, y se encuentra conservado en aislamientos clínicos circulantes, lo que sugiere que podría cumplir un rol importante en alguna de las etapas del proceso de infección. Con base en estas consideraciones, en el presente capítulo se describe una serie de experimentos llevados a cabo para evaluar el impacto de la ausencia de BP1492 en la regulación de fenotipos asociados a la patogénesis de *B. pertussis*.

Formación de *biofilm in vitro*

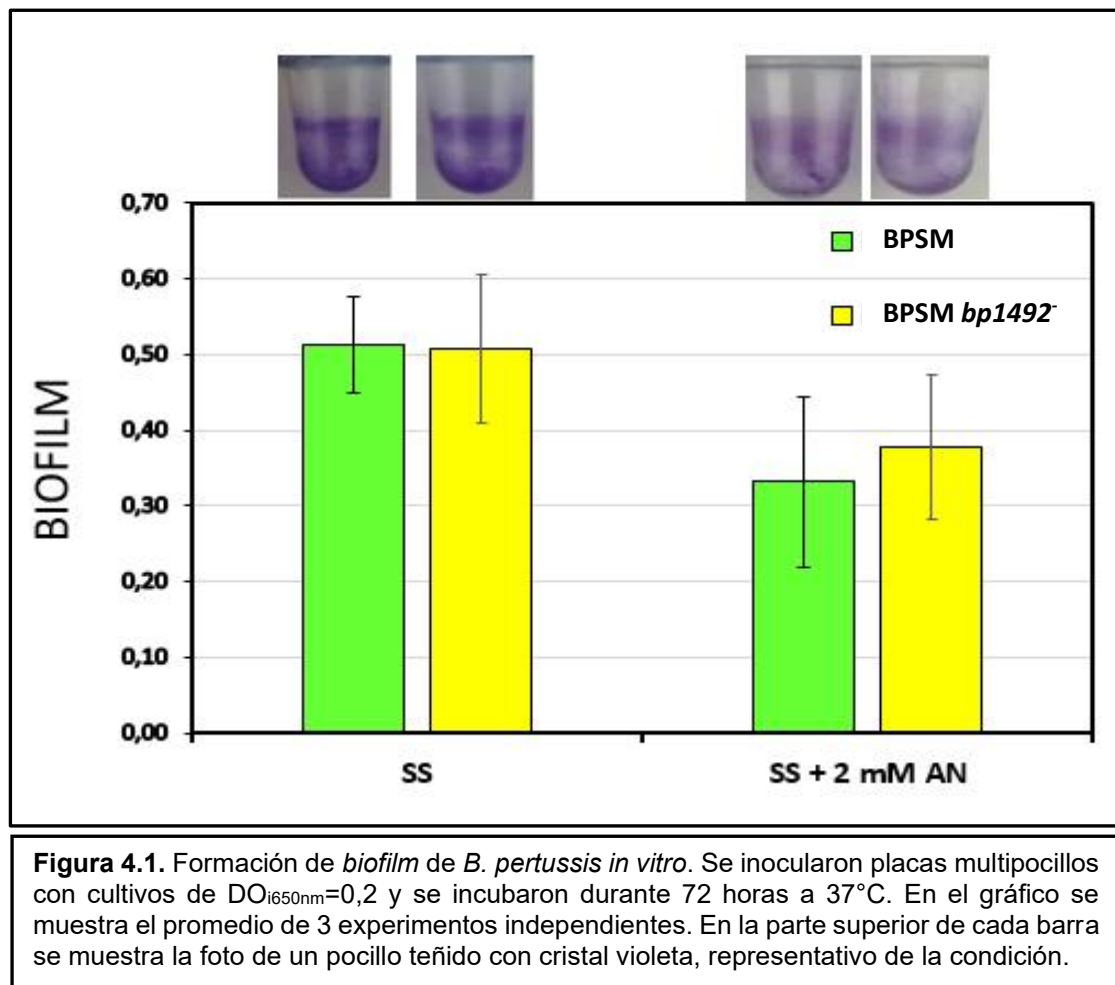
La capacidad de *B. pertussis* de formar *biofilm* ha sido descrita en varios trabajos, tanto *in vitro* como *in vivo*^{36,140}. Además, se ha propuesto que dicha forma de vida de la bacteria podría ser importante para el establecimiento de infecciones persistentes en el tracto respiratorio de mamíferos, lo que facilitaría a su vez la dispersión del patógeno a otros huéspedes²²¹.

Considerando que BP1492 es una DGC catalíticamente activa, y que ya ha sido reportado un rol para c-di-GMP en el control de la formación de *biofilm* en *B. pertussis*¹⁴⁰, hipotetizamos que la delección de BP1492 podría generar una disminución de la producción del segundo mensajero y por lo tanto una disminución en la formación de *biofilm*.

Para testear dicha hipótesis se llevaron a cabo ensayos de formación de *biofilm* en microplacas de PVC. A partir de un cultivo en medio líquido de las cepas a ensayar, se inoculó la placa con una $DO_i=0,2$ y se incubó durante 72 horas a 37 °C. El ensayo fue realizado en medio SS (fase virulenta) y también en medio SS suplementado con AN 2,0 mM para evaluar el comportamiento en fase intermedia.

Como se muestra en la Figura 4.1, no se observaron diferencias significativas entre las cepas salvaje y mutante en ninguna de las condiciones ensayadas, lo que sugiere que

la delección de *bp1492* no afecta la formación de *biofilm* de *B. pertussis*, al menos en las etapas iniciales.



Resistencia a estrés oxidativo

La producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) es uno de los mecanismos utilizados por las células del sistema inmune para la eliminación de los patógenos bacterianos. Moléculas de este tipo tales como el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo (OH^\bullet), pueden generar daños en el ADN, proteínas y membranas celulares, llevando así a la muerte bacteriana²²². La capacidad de las bacterias de mitigar el impacto de estas condiciones de estrés oxidativo sobre su integridad física y metabólica constituyen una de las estrategias de persistencia en este tipo de nichos hostiles.

Un número creciente de trabajos han dado cuenta en los últimos años de la relación entre el segundo mensajero c-di-GMP y la resistencia a estrés oxidativo en distintos organismos. Un ejemplo concreto es el de *M. smegmatis*. En este patógeno la

incubación con H_2O_2 induce un aumento intracelular de c-di-GMP, que a su vez favorece la expresión de genes involucrados en la resistencia a dicho estrés²²³. Por otra parte, Stempel y colaboradores demostraron que el estrés oxidativo inducido por hipoclorito (HClO) induce un aumento intracelular de c-di-GMP en *P. aeruginosa*, e identificaron a la DGC PA3177 como la responsable de dicha respuesta²²⁴.

Para evaluar el impacto de la delección de *bp1492* en la resistencia al estrés oxidativo en *B. pertussis*, se llevaron a cabo ensayos de supervivencia a peróxido de hidrógeno con las cepas BPSM (parental) y BPSM *bp1492*-. Para ello, las bacterias fueron cultivadas en medio SS por 18 horas en las condiciones de cultivo estándar de *B. pertussis*, a partir del cual se preparó un inóculo conteniendo 3×10^4 UFC/ml. Seguidamente, se incubó a las bacterias durante 1 hora en medio SS conteniendo peróxido de hidrógeno en concentración 0,1 mM. Se realizaron recuentos de bacterias en placa antes y después de la incubación, y se calculó el porcentaje de supervivencia.

Como se observa en la Figura 4.2, no se observaron diferencias en el porcentaje de supervivencia de las cepas salvaje y mutante, lo que indica que BP1492 no estaría involucrada en la resistencia al estrés oxidativo, al menos en estas condiciones experimentales.

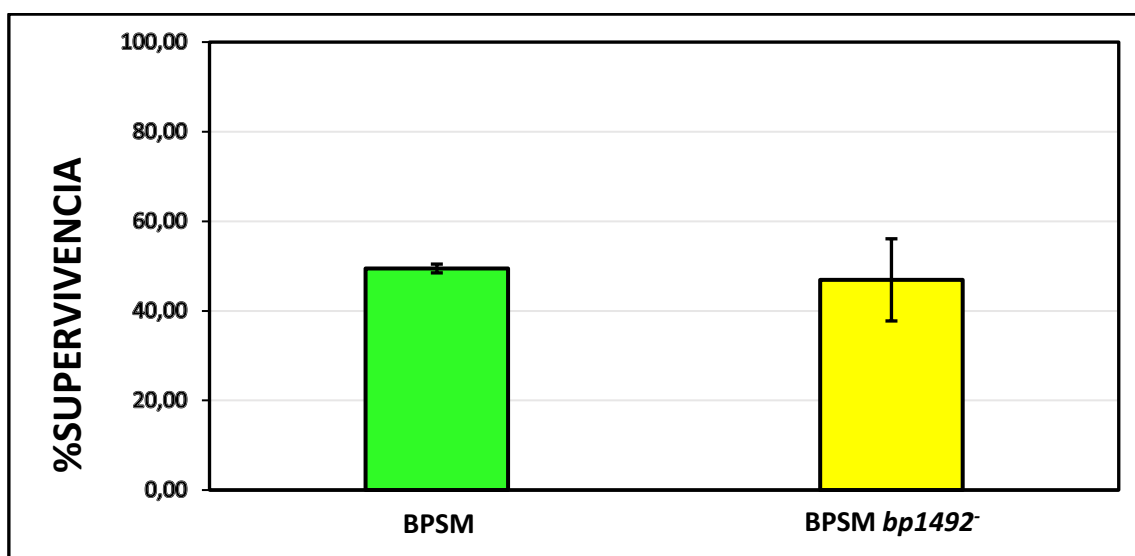


Figura 4.2. Rol de BP1492 en la resistencia a estrés oxidativo. Un inóculo de 3×10^4 UFC/ml de cada cepa fue incubado durante 1 hora en medio SS con 0,1 mM de H_2O_2 . Se realizaron recuentos en placa antes y después de la incubación. Se calculó el porcentaje de supervivencia para las cepas BPSM y BPSM 1492- realizando recuentos antes y después de la incubación. En el gráfico se muestra el promedio de tres experimentos independientes.

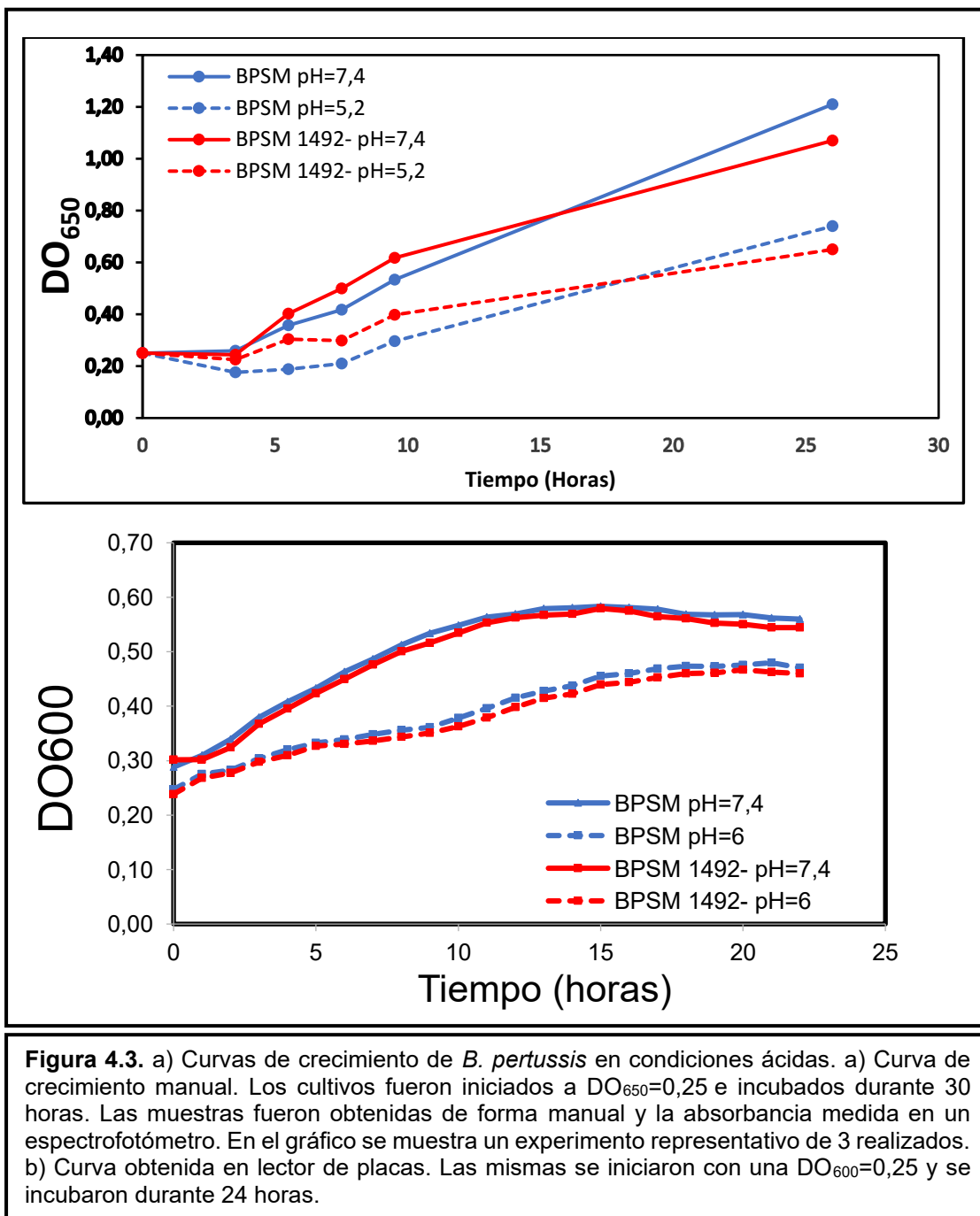
Resistencia a estrés ácido

Durante el transcurso de este trabajo de tesis, en nuestro laboratorio surgieron resultados que señalaban que c-di-GMP estaría involucrado en la regulación de la resistencia a estrés ácido en *B. bronchiseptica*. Más precisamente, la delección de la DGC BdcB indujo una disminución en la capacidad de la bacteria de sobrevivir a un pH letal (Tesis K. Belhart, 2022).

Debido a que estas condiciones ambientales pueden ser enfrentadas por *B. pertussis* en el contexto de la infección de distintos tipos de células de mamíferos, sobre todo durante la formación del fagosoma y la fusión con el lisosoma para la eliminación de la bacteria²²⁵, la regulación de la resistencia a estrés ácido por c-di-GMP podría conectarse con una mayor supervivencia en ese tipo de nichos. Por lo tanto, nos propusimos evaluar si la delección de *bp1492* afecta la capacidad de la bacteria de adaptarse y/o resistir en condiciones de estrés ácido.

Cinética de crecimiento a pH ácido

Para evaluar si la ausencia de BP1492 tiene un impacto en la capacidad de *B. pertussis* de crecer en condiciones ácidas, se construyeron curvas de crecimiento a pH ácido de las cepas BPSM y BPSM *bp1492*. Previamente, se realizó el mismo ensayo en SS estándar (pH=7,4), para corroborar que la delección de *bp1492* no produjera un defecto en el crecimiento de *B. pertussis*. En la Figura 4.3.a se observa que en el medio de cultivo estándar (condición de pH cercano a la neutralidad) la curva de crecimiento de la cepa mutante en *bp1492* es idéntica a la obtenida para la cepa parental (líneas llenas). Para evaluar el crecimiento en condiciones ácidas, se probaron medios de cultivo SS con distintos pH, y se eligió un medio de pH=5,2 como representativo de la condición de estrés ácido, ya que fue el menor pH al cual se observó que las bacterias presentaron crecimiento. Habiendo definido esto, las bacterias fueron inoculadas en *erlenmeyers* con una DO_{650} inicial de 0,25 y cultivadas durante 30 horas a 37°C. Se obtuvieron muestras de los cultivos en 6 puntos para seguir el desarrollo del cultivo a través de la medida densidad óptica y se construyeron las curvas de crecimiento para las cepas parental y mutante (Figura 4.3.a, líneas punteadas). En concordancia con reportes previos, la velocidad de crecimiento y la DO_{650} máxima alcanzada de la cepa parental se vio disminuida en la condición de pH ácido con respecto a la condición estándar²²⁶. Por otra parte, esa disminución fue de igual magnitud para la cepa mutante en *bp1492*, demostrando que la falta de esta proteína no afecta la capacidad de la bacteria de crecer en una condición de estrés ácido.



Con el objetivo de estandarizar el método y poder obtener curvas de crecimiento más reproducibles, se intentó realizar el cultivo microbiano en placas de 24 fosas en un lector de placas. Al intentar repetir las condiciones de cultivo utilizadas en la construcción manual de la curva de crecimiento, se observó que las bacterias no podían crecer en un $pH=5,2$, por lo que se debió modificar el medio a uno de $pH=6$. Como se muestra en la Figura 4.3.b, el resultado obtenido fue similar al obtenido con el método anterior, con

una disminución en la velocidad de crecimiento y una menor DO_{600} alcanzada al final del cultivo para la condición de pH ácido, pero sin diferencias entre cepas.

La conclusión de esta serie de ensayos es que BP1492 no estaría involucrada en la capacidad de la bacteria de crecer en condiciones de estrés ácido.

Supervivencia a estrés ácido

Otra forma de evaluar si BP1492 participa en la respuesta de *B. pertussis* al estrés ácido consistió en analizar la supervivencia de las cepas luego de ser sometidas a un shock de pH bactericida. La idea de este ensayo es encontrar unas condiciones de incubación tales que garanticen un efecto bactericida, pero sin causar la muerte de la totalidad de las bacterias. Para ello, se debieron poner a punto condiciones tales como la concentración de inóculo inicial, pH de incubación y tiempo de incubación.

Finalmente, se llevó a cabo la incubación de las cepas BPSM y BPSM *bp1492*⁻ durante 2 horas en medio SS a pH=4 con una concentración de bacterias inicial de 3×10^5 UFC/ml. Se realizaron recuentos bacterianos antes y después de la incubación para evaluar la supervivencia de cada cepa.

Como se muestra en la Figura 4.4, la cepa salvaje mostró una caída de un orden de magnitud en la cantidad de bacterias, demostrando que el tratamiento presenta actividad bactericida. Por su parte, la incubación en pH ácido de la cepa mutante en *bp1492* arrojó como resultado una caída en la cantidad de bacterias de casi dos órdenes de magnitud, demostrando que la sensibilidad de esta cepa al shock ácido es mayor que la de la cepa parental. Cabe mencionar que fue realizada en paralelo la incubación de ambas cepas a pH neutro, donde no se observó muerte bacteriana. Este resultado indica que BP1492 sería importante para la respuesta de la bacteria al shock ácido.

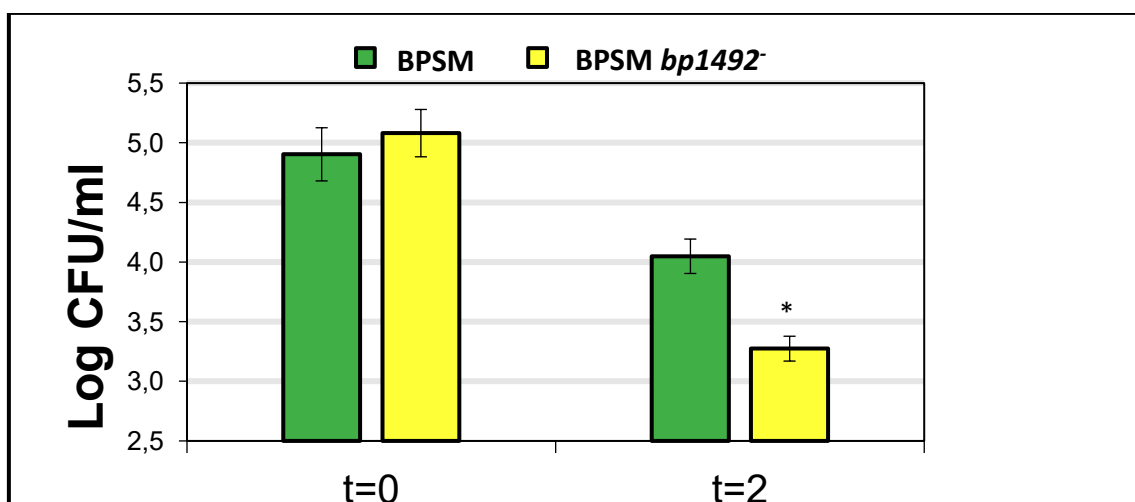


Figura 4.4. Resistencia a estrés ácido. Un inóculo de 3×10^5 UFC/ml de cada cepa fue incubado durante 2 horas en medio SS a pH=4. Se realizaron recuentos en placa antes y después de la incubación. En el gráfico se muestra el promedio de tres experimentos independientes. En cada uno de ellos, la cantidad de bacterias fue expresada en forma logarítmica para facilitar el análisis y la visualización de los resultados. (*) indica diferencia significativa con $p < 0,05$ (prueba t de Student).

Ensayo de sobrevida en células eucariotas

Con base en resultados obtenidos en nuestro laboratorio que demuestran la importancia de una DGC de *B. bronchiseptica* para la sobrevida en células fagocíticas (Tesis K. Belhart; 2022) nos propusimos evaluar si BP1492 podría estar involucrado en el control de este mecanismo de patogénesis en *B. pertussis*.

Como se describió en la introducción, las bacterias del género *Bordetella* son capaces de invadir y sobrevivir intracelularmente en células A549, un modelo de epitelio respiratorio muy usado para estudiar la interacción patógeno-hospedador^{68,71,227}.

Con el objetivo de evaluar si la mutación en BP1492 tiene algún efecto en la capacidad de *B. pertussis* de invadir y sobrevivir en una línea celular de epitelio respiratorio, se llevó a cabo un ensayo de supervivencia en células A549. El mismo se compone de una primera etapa donde se realiza una co-incubación (MOI=100) para permitir la adhesión e internalización de las bacterias. Seguidamente, se procede a un tratamiento con polimixina B, un antibiótico que no puede penetrar en las células eucariotas vivas y por lo tanto elimina únicamente las bacterias no internalizadas. Finalmente, las bacterias se recuperan del interior de las células A549 mediante un mecanismo de lisis a las 3 y 24 horas post-infección y se realiza un recuento de UFC en placas de BGA.

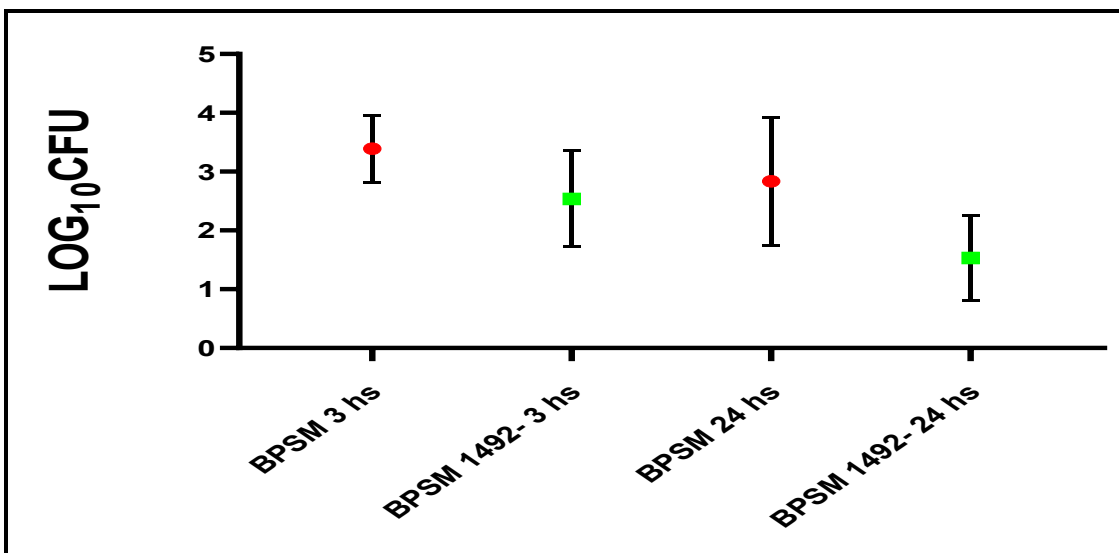


Figura 4.5. Sobrevida de *B. pertussis* en células A549. Las células se incubaron con las bacterias a una MOI de 100. Las bacterias fueron recuperadas del interior celular transcurridas 3 y 24 horas luego del agregado de Polimixina B. En el gráfico se muestra un experimento representativo de 3 realizados.

Como se observa en la Figura 4.5, no se observaron diferencias significativas en la capacidad de la cepa mutante en *bp1492* de sobrevivir en este tipo celular a ninguno de los tiempos ensayados, en comparación a la cepa parental. Esto indica que BP1492 no

estaría involucrada en la capacidad de *B. pertussis* de invadir y sobrevivir en el interior de células A549, al menos en las condiciones de este ensayo.

Conclusiones y discusión

En este capítulo se describen distintos experimentos dirigidos a determinar el rol de la DGC BP1492 en el control de fenotipos asociados a la patogénesis de *B. pertussis*.

Como se mencionó en capítulos previos, la señalización por c-di-GMP puede participar en el control de diversos procesos celulares relacionados directa o indirectamente con la virulencia, siendo la regulación de la transición entre vida planctónica y sésil el más estudiado. Por lo tanto, la primera hipótesis que nos planteamos fue que BP1492 podría participar en la regulación de la formación de *biofilm*. Como antecedente, un trabajo llevado a cabo por Wan y colaboradores demuestra que la delección de la DGC BpeGReg produce una disminución en la formación de *biofilm in vitro* respecto a la cepa parental¹⁴⁰, lo que constituyó el primer indicio de que una proteína relacionada al metabolismo de c-di-GMP podría estar involucrada en la regulación de un fenotipo asociado a la patogénesis de *B. pertussis*. Sin embargo, los experimentos de *biofilm* realizados con la cepa BPSM *bp1492* no arrojaron diferencias significativas con respecto a la cepa parental, lo que se suma al resultado presentado en el capítulo anterior, donde la sobreexpresión de *bp1492* tampoco produjo diferencias en la formación de *biofilm*. En conjunto, estos experimentos parecen indicar que BP1492 no estaría involucrado en la regulación de este proceso, en las condiciones analizadas.

Durante el transcurso de este trabajo, se obtuvieron en nuestro laboratorio resultados experimentales que sugerían una relación entre c-di-GMP y la resistencia a estrés ácido en *Bordetella*. Se pudo demostrar que la sobreexpresión de una DGC activa en *B. bronchiseptica* induce un aumento en la supervivencia a la exposición a un pH bactericida, sugiriendo por primera vez una conexión entre niveles globales de c-di-GMP elevados y la resistencia a estrés ácido en el género *Bordetella*. En un análisis más detallado se demostró que BdcB participa de manera específica en este fenotipo, dado que su delección indujo una caída significativa en la supervivencia (Tesis K. Belhart, 2022). Considerando estos antecedentes, nos propusimos evaluar si BP1492 podría estar involucrada en la resistencia al estrés ácido en *B. pertussis*.

La evaluación de la resistencia y adaptabilidad al estrés ácido se realizó a través de dos tipos de ensayos diferentes. En primer lugar, la evaluación del crecimiento bacteriano en una condición no bactericida, que es lo que se evaluó en medios con pH iguales o superiores a 5,2. En estas condiciones, la presencia o ausencia de BP1492 fue irrelevante para el crecimiento de *B. pertussis*. Sin embargo, cuando se expuso a las

bacterias a un pH bactericida, se observó que la cepa que no expresa BP1492 presenta un defecto significativo en la capacidad de resistir dicha condición. Es interesante resaltar que este valor de pH es similar al determinado experimentalmente para fagolisosomas de macrófagos conteniendo a *B. pertussis*²²⁵. Por lo tanto, es probable que BP1492 participe de alguna manera en la adaptación de *B. pertussis* a la condición de estrés ácido, lo que se traduciría en una mayor capacidad de sobrevivir en la célula hospedadora. En un trabajo realizado por Fingerhann y Hozbor, se describió que la condición de estrés ácido induce cambios de expresión de proteínas que se traducen en modificaciones en la composición de la membrana en *B. bronchiseptica*, principalmente asociadas a cambios en el LPS y proteasas específicas²²⁸. Considerando estas observaciones, un escenario posible es que BP1492 participe en la regulación de la composición de la membrana celular a través del control directo o indirecto de la expresión de proteínas.

Con el objetivo de confirmar si la diferencia obtenida en este ensayo es consecuencia directa de la falta de BP1492, se buscó realizar la complementación de la cepa mutante *bp1492-* con la expresión *en trans* de la proteína. Sin embargo, al realizar este experimento con las cepas que contienen plásmido (ya sea vacío o con *bp1492* clonado), se obtuvieron resultados dispersos y muy variables entre repeticiones, incluso con varios ensayos donde la resistencia a estrés ácido fue nula. Esto nos impidió terminar de confirmar si BP1492 se encuentra involucrada de forma específica en la resistencia a estrés ácido. Creemos que este problema puede verse asociado a la carga energética que representa para la bacteria el mantenimiento del plásmido y la expresión de una proteína en grandes cantidades, lo que en un contexto de estrés como el de este ensayo puede tener consecuencias para la viabilidad. La imposibilidad de complementar la cepa BPSM *bp1492-* con la proteína de forma ectópica, limita nuestra capacidad de sacar conclusiones sobre la importancia de BP1492 en este proceso.

Por último, se evaluó si BP1492 posee algún rol en la capacidad de *B. pertussis* de sobrevivir en células de epitelio respiratorio. A pesar de tratarse de un patógeno históricamente considerado como extracelular, en los últimos años se ha reportado en varios trabajos la capacidad de *B. pertussis* de invadir y sobrevivir en distintos tipos celulares eucariotas, mecanismo que ha sido propuesto como una posible estrategia del patógeno para evadir la respuesta inmune del huésped y conformar un reservorio que luego podría servir para la diseminación a otros tejidos y/o la transmisión a otros huéspedes^{71,73}. La acidificación del fagosoma es una de las estrategias de las células fagocíticas para eliminar al patógeno internalizado, por lo que un requisito para la supervivencia del patógeno es la capacidad de resistir el daño que puede generar esa condición²²⁹. Por lo tanto, la deficiencia de la cepa mutante en *bp1492* en la

supervivencia al shock ácido podría tener como consecuencia una alteración en la capacidad de *B. pertussis* de sobrevivir en el hospedador. Con base en estas consideraciones, se decidió evaluar la viabilidad bacteriana intracelular en células epiteliales A549. Se realizó el recuento de UFC a las 3 y 24 horas posteriores al tratamiento con Polimixina B, para determinar si la falta de BP1492 genera un defecto en la sobrevida. Sin embargo, el análisis de los recuentos de las UFC recuperadas de las células infectadas no arrojó diferencias significativas entre cepas, lo que sugiere que no existen diferencias en la capacidad de adaptación y sobrevida en este tipo celular. Cabe mencionar que el estadio de vida intracelular de *B. pertussis* se encuentra descrito con mayor detalle en células de macrófagos^{70,191,230}. La realización de ensayos de sobrevida en ese tipo celular permitiría complementar los obtenidos en células epiteliales y quizás permitirían evidenciar el rol de BP1492 con mayor precisión.

Capítulo V: Rol de una proteína de membrana en la regulación por c-di-GMP en *Bordetella*

Introducción

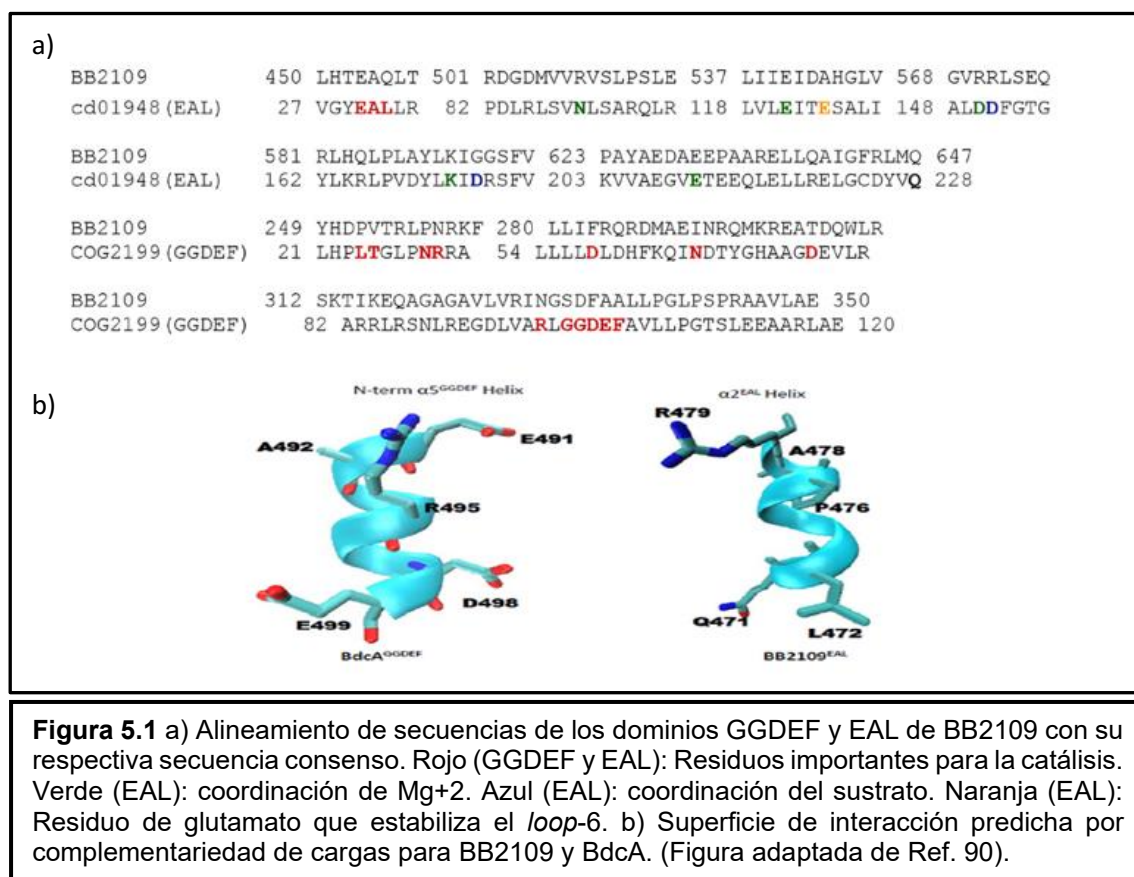
Como se describió en la introducción de este trabajo, las proteínas relacionadas al metabolismo de c-di-GMP pueden cumplir roles en mecanismos de señalización que no dependan exclusivamente de su capacidad de sintetizar y/o degradar este segundo mensajero. En base a observaciones y resultados que se describen a continuación, la proteína codificada por el gen *bp1092* de *B. pertussis*, podría representar un caso de este tipo de proteínas.

Nuestro grupo de trabajo ha estudiado en los últimos años a BB2109 de *B. bronchiseptica*, homóloga a BP1092. A continuación, se describen los antecedentes relacionados a esta proteína, parte de los cuales han sido publicados en un trabajo científico⁹⁰, y cuya descripción resulta necesaria para dar contexto a las hipótesis y resultados que se describen a lo largo del presente capítulo.

BB2109 es una proteína con localización en la membrana celular que presenta tres dominios identificables: un dominio GGDEF, un dominio EAL y un dominio histidina quinasa (HK). Como se describió en la introducción, es frecuente que las proteínas que presentan conjuntamente ambos dominios relacionados al metabolismo de c-di-GMP presenten dominios degenerados, es decir, que no tienen capacidad de sintetizar o degradar c-di-GMP por la falta de conservación de los residuos catalíticos en sus sitios activos. El análisis de conservación en los dominios EAL y GGDEF de BB2109 sugiere que se trata de un caso de este tipo. En la figura 5.1.a se muestran los alineamientos correspondientes de la secuencia de cada dominio con su respectiva secuencia consenso. En el caso del dominio fosfodiesterasa, no presenta el motivo EAL conservado, los residuos importantes para la coordinación de Mg^{+2} (cofactor clave para la catálisis), los residuos importantes para la coordinación del sustrato, ni el residuo de glutamato importante para la estabilización de la estructura catalítica^{116,231}. Por el lado del dominio GGDEF, BB2109 no presenta conservado el motivo catalítico GG(D/E)EF en el sitio activo. Como conclusión de este análisis, tanto el dominio EAL como el GGDEF de BB2109 serían catalíticamente inactivos.

El rol biológico de BB2109 fue evidenciado como parte del estudio de la regulación de la formación de *biofilm* y la movilidad mediada por BdcA. BdcA es una DGC de membrana de *B. bronchiseptica* cuya sobreexpresión inhibe la movilidad e incrementa la formación de *biofilm*. Con el objetivo de explicar el mecanismo de esta regulación, se buscó identificar el o los efectores moleculares involucrados en las vías de señalización en las cuales participa BdcA. Como se mencionó en la introducción, las proteínas con dominios GGDEF y/o EAL inactivos han sido propuestas como posibles efectores de c-di-GMP, ya que en general conservan la capacidad de unir el segundo mensajero¹²⁴.

Adicionalmente, se detectó una posible interacción física entre el dominio EAL de BB2109 y el dominio GGDEF de BdcA (Figura 5.1.b), con base en un modelo diseñado por Dahlstrom y colaboradores¹⁸⁴. Este modelo propone que los dominios EAL y GGDEF pueden interactuar a través de una zona de alfa hélice particular. Si bien estructuralmente ambas zonas se conservan, los residuos expuestos cambian, generando pares de interacción específicos. Los autores los denominan *reader* y *barcode*, simulando que el dominio GGDEF puede “leer” diferentes códigos de barras hasta encontrar el correcto. Si hay coincidencias, la interacción ocurre y se generan cambios conformacionales que permiten expresar el fenotipo correspondiente.



Finalmente, se demostró experimentalmente que BB2109 es necesaria para la inhibición de movilidad y aumento de *biofilm* mediados por BdcA. Más aún, se midieron los niveles de c-di-GMP globales en bacterias sobreexpresando BdcA y se encontró que sólo se producía un aumento en la síntesis del segundo mensajero en el entorno salvaje, pero no así en el entorno mutante BB2109, lo que demuestra que BB2109 es requerida por BdcA para poder llevar a cabo la síntesis de c-di-GMP. Este requerimiento específico se ve reforzado por el hecho de que otra DGC, en este caso citoplasmática, BdcB, regula la formación de *biofilm* y la movilidad de forma independiente de BB2109. Por lo tanto,

es evidente que el rol de BB2109 no se relaciona a una respuesta a la elevación de los niveles de c-di-GMP globales, sino más bien a una respuesta local relacionada a su capacidad de interactuar funcionalmente con BdcA.

En conjunto, estos resultados sugieren que BdcA y BB2109 participarían en una misma vía de señalización para regular la movilidad y la formación de *biofilm* en *B. bronchiseptica*. Adicionalmente, esta regulación parece ser consecuencia de una interacción específica entre ambas proteínas y no de un efecto del aumento global de c-di-GMP. En nuestro modelo de trabajo, uno de los mecanismos que podrían aportar especificidad a esta señalización sería una interacción física entre ambas proteínas. Como antecedente relevante, BdcA también interactúa con LapD, otra proteína GGDEF-EAL de membrana de *B. bronchiseptica*, para regular la formación de *biofilm*. En el estudio de dicha interacción, se pudo demostrar a través de ensayos de doble híbrido que existe una interacción física entre ambas proteínas (Tesis N. Ambrosis; 2018). Con el objetivo de evaluar si BdcA es capaz de interactuar físicamente también con BB2109, se buscó reproducir dicho ensayo con el par BdcA-BB2109. Sin embargo, debido a dificultades para la obtención de las construcciones necesarias, no se pudo corroborar experimentalmente si estas proteínas interactúan físicamente.

Comparación BP1092-BB2109

Considerando el mecanismo descrito en *B. bronchiseptica*, detallado en la sección anterior, nos preguntamos si una vía de señalización similar podría estar involucrada en la regulación de la formación de *biofilm* u otros fenotipos asociados a c-di-GMP en *B. pertussis*. Como punto de partida para abordar esta incógnita, se realizó la comparación a nivel de secuencia de aminoácidos de BB2109 y su homóloga BP1092, para evaluar el grado de conservación entre especies.

BB2109 se encuentra anotada en el genoma de referencia de *B. bronchiseptica* RB50 como una proteína de 960 aminoácidos, mientras que BP1092 del genoma de *B. pertussis* se encuentra anotada como una proteína de 949 aminoácidos. Se realizó un alineamiento de pares utilizando la herramienta EMBOSS Needle, con el objetivo de evaluar las diferencias a nivel de secuencia entre ambas proteínas. Como se muestra en la Figura 5.2.a, ambas secuencias presentan un porcentaje de identidad muy alto (98,3%). Además, se observa que BB2109 tiene 10 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal que no forman parte de la proteína BP1092. Para determinar si esta discrepancia realmente posee significado biológico, se analizó la secuencia de nucleótidos de esa región en ambos genomas. Como se muestra en la Figura 5.2.b, ambas secuencias nucleotídicas son idénticas al 100%, sugiriendo que la discrepancia

en el alineamiento se relaciona con la forma en que fueron anotadas estas proteínas en los genomas de referencia secuenciados. En el caso de BP1092, el sitio de inicio de la traducción fue anotado en el codón ATG inmediatamente posterior a la región resaltada en amarillo. Por el contrario, en la secuencia de BB2109 dicha región (resaltada en verde) se encuentra considerada como parte del marco de lectura abierto ya que el mismo fue anotado a partir de un sitio de inicio de la traducción alternativo GTG. Esta gran similitud nos permite adoptar como hipótesis de trabajo que el estudio del rol de BB2109 en el entorno de *B. bronchiseptica*, y el análisis de posibles interactores, es una buena herramienta para obtener indicios acerca del rol de BP1092 y sus posibles interactores en *B. pertussis*. El uso de esta hipótesis como punto de partida para estudiar este sistema presenta ventajas que se describirán en las secciones subsiguientes.

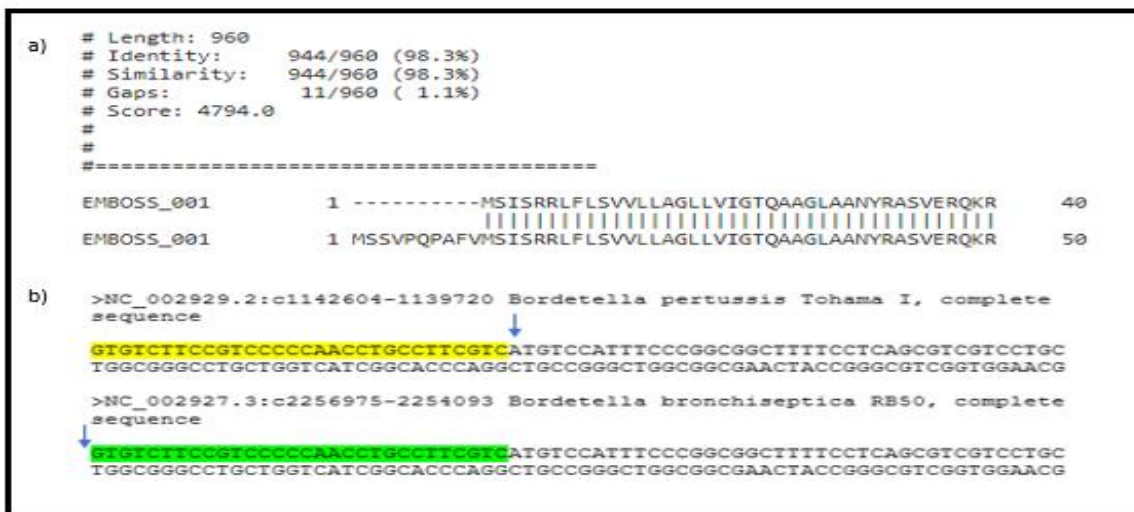


Figura 5.2. (a) Resultado del alineamiento entre BB2109 y BP1092. (b) Análisis de la secuencia nucleotídica del sitio de inicio de la traducción de BB2109 y BP1092. Las flechas indican el sitio de inicio correspondiente a la anotación en el genoma de referencia.

Búsqueda de posibles interactores de BP1092

El primer objetivo que nos propusimos abordar fue el de identificar el o los posibles pares interactores de BP1092 en *B. pertussis*. Como se describió en capítulos anteriores, varios de los genes que codifican para DGC son compartidos entre *B. bronchiseptica* y *B. pertussis*. Sin embargo, BdcA es una proteína exclusiva de *B. bronchiseptica* para la cual no se encuentran homólogos en *B. pertussis*. Estas observaciones nos condujeron a hipotetizar que en *B. pertussis* podría haber otra/s DGC que estuvieran interactuando con esta proteína de membrana, cumpliendo una función similar a la de BdcA en *B. bronchiseptica*.

Debido a la falta de un ensayo sencillo que nos permitiera evaluar estas posibles interacciones funcionales en *B. pertussis*, se usó como modelo a *B. bronchiseptica*. La

estrategia fue identificar la interacción de BB2109 con otras DGC en *B. bronchiseptica* a través del ensayo de inhibición de movilidad, debido a que es un experimento sencillo y que otorga resultados reproducibles.

Se fijaron ciertas condiciones para seleccionar las proteínas que podrían formar parte de este análisis. En primer lugar, deberían ser proteínas con dominio GGDEF que estuvieran presentes tanto en *B. pertussis* como en *B. bronchiseptica*. De esta búsqueda inicial surgieron 4 posibles candidatas: BP2465 (BdcB); BP1441 (BB2626); BP3507 (BB1960); BP0338 (BB4664).

La primera proteína de las posibles (BP2465) fue descartada por dos motivos: en primer lugar, porque se trata de una proteína sin dominios o segmentos transmembrana identificables, lo que hace improbable que se trate de una proteína de membrana. Esto no va en línea con nuestra hipótesis de que existiría una señalización local entre BP1092 y la DGC asociada en la membrana celular. En segundo lugar, BdcB ha sido estudiada en el marco de otra tesis doctoral en nuestro laboratorio y se ha demostrado que, si bien su sobreexpresión inhibe por completo la movilidad bacteriana, esto ocurre de forma independiente de BB2109⁹⁰.

Por otra parte, la DGC de *B. bronchiseptica* BB2626 (homóloga a BP1441) ya ha sido estudiada previamente en nuestro laboratorio y se ha observado que no es capaz de inhibir la movilidad al ser sobreexpresada (Tesis N. Ambrosis; 2018), por lo que fue descartada de este diseño experimental.

La tercera candidata es la proteína codificada por el gen *bp3507* (*bb1960*), que codifica para la proteína BpeGreg, ya descrita como una DGC que une oxígeno y estaría involucrada en la formación de *biofilm* de *B. pertussis in vitro*¹⁴⁰. Sin embargo, esta proteína no sería de membrana, por lo que la descartamos de este análisis.

En cuanto a *bp0338*, codifica para una DGC que en el N-terminal posee seis regiones transmembrana predichas, lo que indica una probable localización en la membrana celular. Por su parte, el sitio catalítico presenta la secuencia GGDEF conservada, lo que sugiere que la proteína debería tener actividad catalítica. No se encontraron antecedentes bibliográficos acerca de BP0338, pero sí de su homólogo en *B. bronchiseptica*, BB4664 (99% de identidad con BP0338). En un trabajo del año 2012, Nicholson y colaboradores llevaron a cabo un estudio transcriptómico de *B. bronchiseptica* durante las distintas etapas de la formación de *biofilm*. En el mismo, analizaron las diferencias en la expresión génica entre cultivos planctónicos y cultivos en condiciones de formación de *biofilm* a las 6, 12, 24, 36 y 48 horas. La expresión del gen *bb4664* se determinó como regulada positivamente de forma significativa a las 48 horas en las condiciones de formación de *biofilm* con respecto a las condiciones de

cultivo planctónico, lo que sugiere que esta DGC tendría un rol importante en las etapas tardías de la formación de *biofilm*²³².

En conclusión, se seleccionó a la DGC BP0338 como posible proteína interactora de BP1092. Como aproximación a determinar si estas proteínas participan en una vía de señalización común, nos propusimos en primer lugar evaluar el sistema homólogo en *B. bronchiseptica*, compuesto por BB2109 y BB4664.

Actividad DGC de BB4664

Para poder estudiar funcionalmente a BB4664 y su posible interacción con BB2109, se amplificó el marco de lectura correspondiente al gen *bb4664* y se clonó en el plásmido pBB5-*nptII*, el cual se utilizó para sobreexpresar la proteína en *B. bronchiseptica*.

En primer lugar, evaluamos la posible actividad DGC de BB4664 analizando la formación de *biofilm* y movilidad tipo *swimming*.

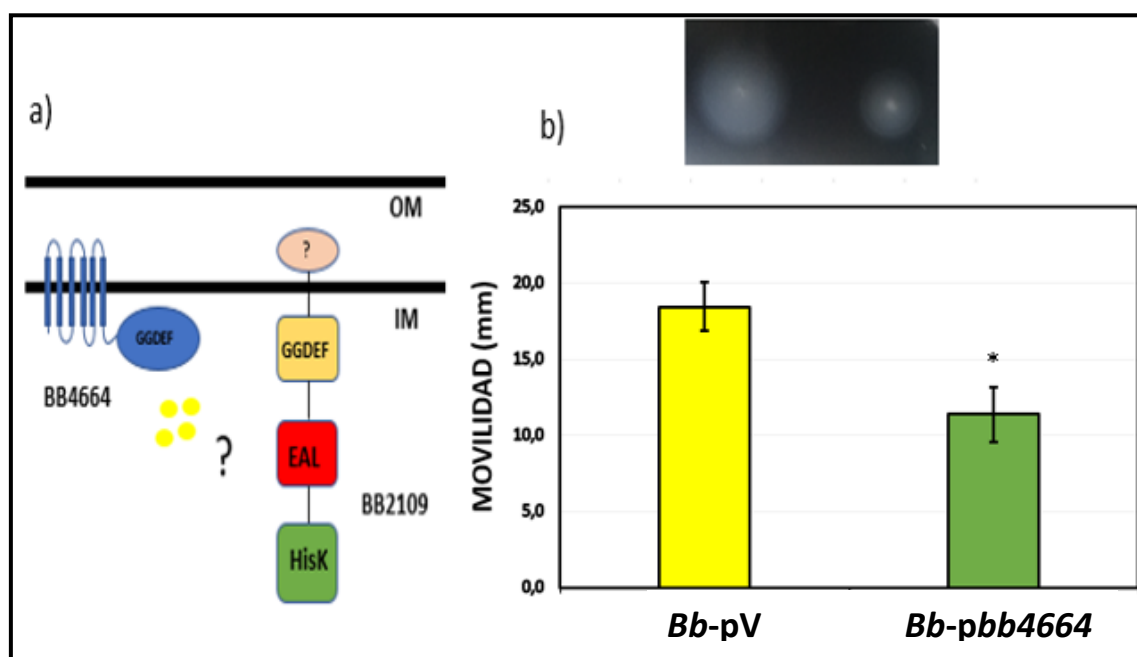


Figura 5.3. a) Esquema de los actores presentes en la membrana plasmática en el experimento de movilidad en *B. bronchiseptica* salvaje. Los círculos amarillos representan al segundo mensajero c-di-GMP. b) Movilidad en agar blando de *B. bronchiseptica* salvaje. En la parte superior se muestra una foto de los halos de movilidad obtenidos tras 18 horas de incubación a 37°C. En el gráfico se muestra el promedio de 3 experimentos independientes. (*) indica significativo con $p < 0.05$, (Prueba t de Student).

Como se observa en la Figura 5.3.b, la sobreexpresión de *bb4664* produjo una inhibición parcial de la movilidad, en términos cuantitativos un 52% de la movilidad observada para

la cepa salvaje que porta el plásmido vacío. Este resultado confirma que la proteína es una DGC activa.

Además, se realizaron ensayos de formación de *biofilm*, no sólo por el rol del general del c-di-GMP en este fenotipo sino a que esta DGC en particular fue reportada como aumentada durante la formación de *biofilm*²³².

Las condiciones que se ensayaron fueron las de 0,5 y 1,0 mM de AN, donde el impacto de c-di-GMP en la regulación de la formación de *biofilm* en *B. bronchiseptica* es más marcado. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre la cepa salvaje y la cepa que sobreexpresa *bb4664* en ninguna de las condiciones ensayadas (Figura 5.4).

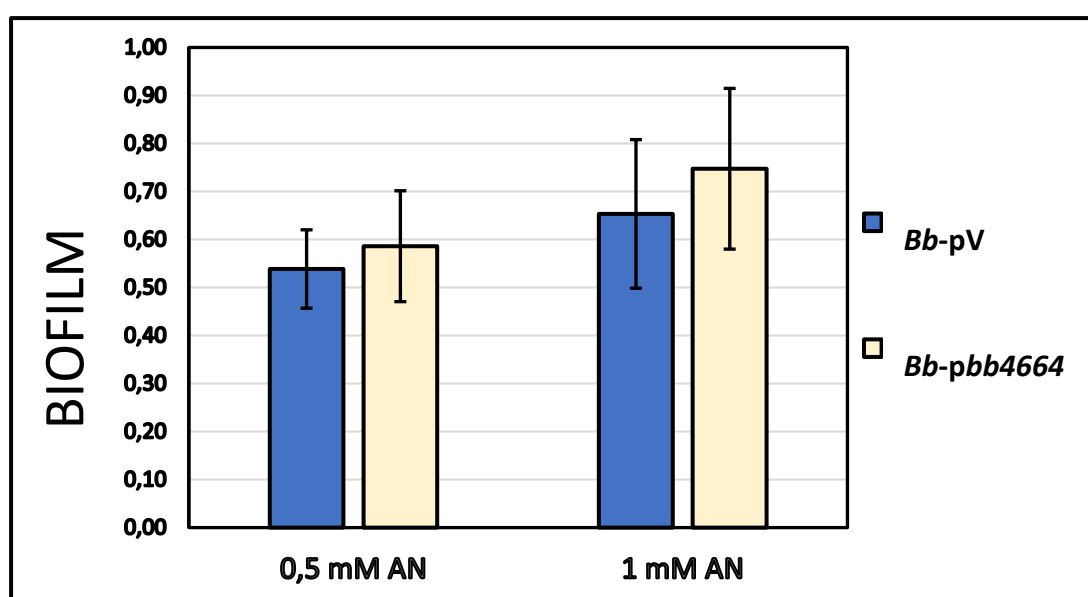


Figura 5.4. Formación de *biofilm* en placa multipocillos de PVC. En el gráfico se muestra el promedio de tres experimentos independientes.

La actividad DGC de BB4664 es dependiente de BB2109

Para estudiar la dependencia de la actividad DGC de BB4664 con la proteína de membrana BB2109, los experimentos de sobreexpresión fueron repetidos utilizando una cepa que tiene interrumpido el marco de lectura del gen *bb2109*, para generar un escenario donde BB2109 no se encontrara en la membrana celular y poder evaluar el impacto que esta ausencia genera en la actividad DGC de BB4664. Se realizaron ensayos de movilidad, comparando la cepa *BbΔbb2109-pV* con *BbΔbb2109-pbb4664* ya que fue el fenotipo modificado por BB4664. Como se observa en la figura 5.5.b, en ese contexto no se observaron cambios en la movilidad bacteriana en el entorno mutante con respecto a la cepa que porta el plásmido vacío. Este resultado muestra que

la inhibición de movilidad mediada por BB4664 depende de la presencia de la proteína BB2109.

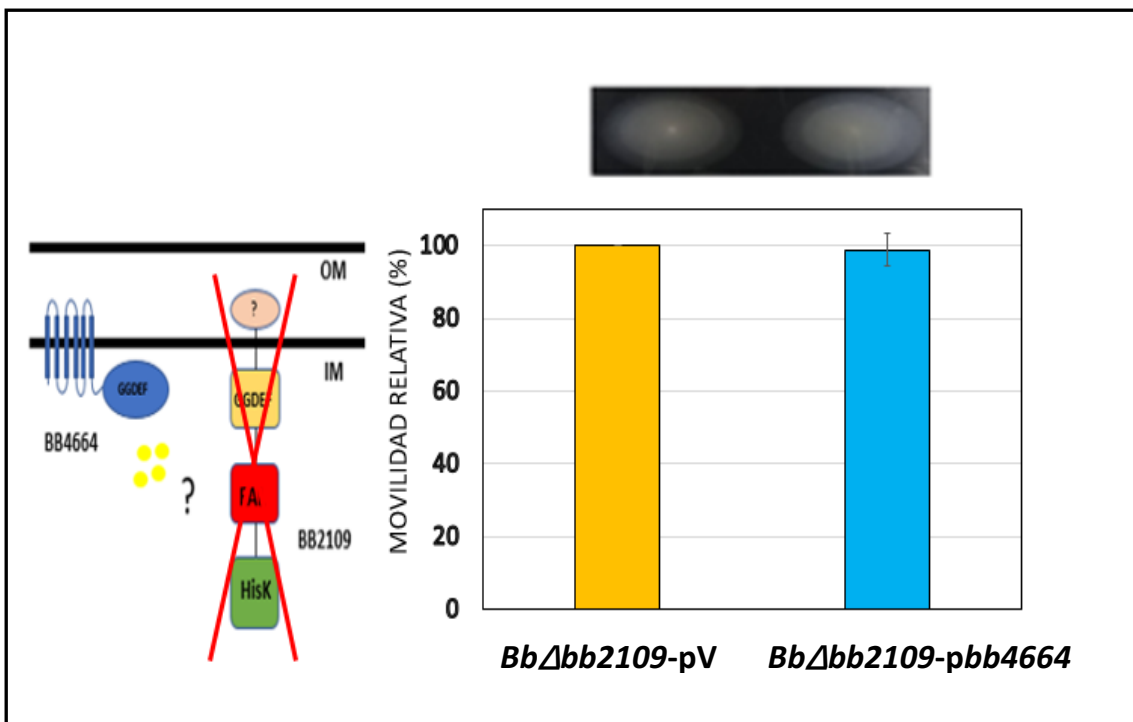


Figura 5.5. a) Esquema de los actores presentes en el experimento de movilidad en *B. bronchiseptica* $\Delta bb2109$. Los círculos amarillos representan el segundo mensajero c-di-GMP b) Movilidad en agar blando en *BbΔbb2109*. En la parte superior se muestra una foto de los halos obtenidos luego de 18 horas de incubación a 37°C. En el gráfico se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Se grafica la movilidad relativa de cada cepa normalizada respecto a la movilidad de la cepa *BbΔbb2109-pV*.

El dominio HK de BB2109 es requerido para la inhibición de la movilidad mediada por BB4664

Como se describió anteriormente, la predicción por métodos bioinformáticos arroja que BB2109 presentaría tres dominios: un dominio GGDEF, un dominio EAL y un dominio histidina quinasa (HK). Habiendo demostrado que BB2109 es importante para la actividad DGC de BB4664, nos planteamos la incógnita acerca de cuál o cuáles dominios/s de BB2109 serían importantes para dicha relación funcional.

Nos propusimos construir cepas de *B. bronchiseptica* que expresaran en el genoma variantes mutadas de la proteína en la cual se hubieran delecionado cada uno de los dominios por separado. Tras varios intentos de obtener dichos mutantes, sólo se tuvo éxito con la construcción de la cepa en el cual se delecionó el dominio HK de la proteína (*B. bronchiseptica* $\Delta HKbb2109$) mientras que no se pudieron obtener las variantes carentes de los dominios GGDEF y EAL debido a la imposibilidad de amplificar por PCR

las secuencias necesarias desde el genoma de *B. bronchiseptica*. Esta dificultad puede deberse al elevado % GC que presenta esta bacteria en general y particularmente en esa zona de genoma.

Para evaluar la actividad de BB4664 en ese entorno genético, se llevaron a cabo experimentos de movilidad. Como puede observarse en el gráfico de la figura 5.6.b y en la foto correspondiente, la sobreexpresión de *bb4664* en la cepa *Bb* Δ HK*bb2109* provocó una inhibición de la movilidad, pero a un nivel significativamente menor que lo observado en el entorno salvaje. En términos porcentuales, la cepa que sobreexpresa *bb4664* presentó una movilidad del 82% respecto a la cepa con el plásmido vacío (en el entorno salvaje esta relación fue del 52%).

Esta diferencia sugiere que el dominio HK de BB2109 estaría involucrado en la inhibición de la movilidad mediada por la DGC BB4664.

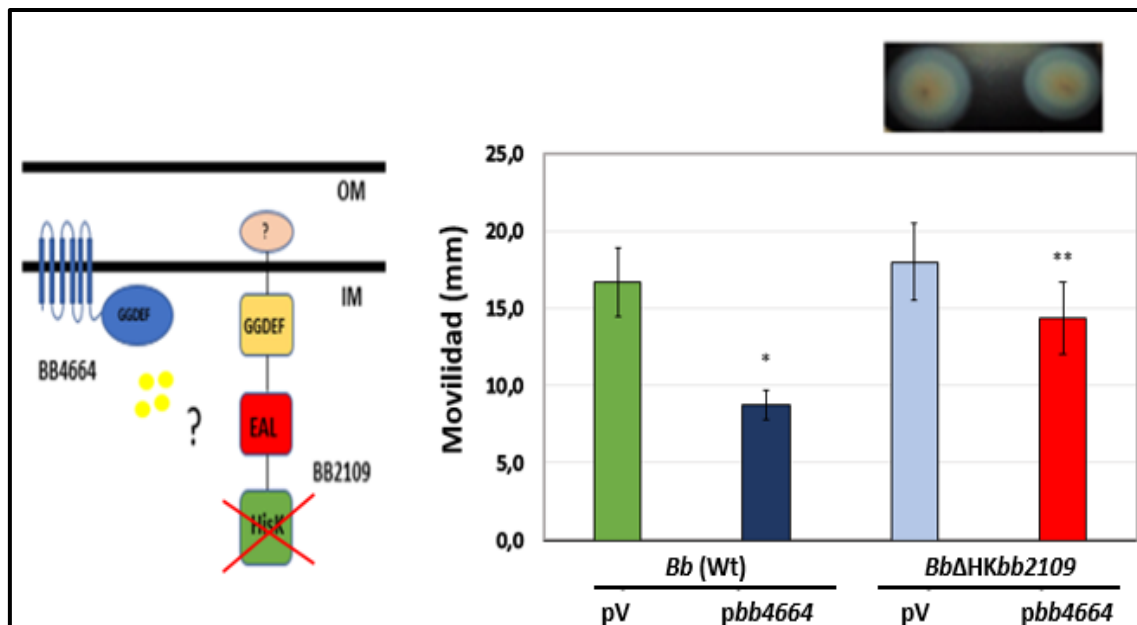


Figura 5.6. a) Esquema de los actores presentes en el experimento de movilidad en *B. bronchiseptica* Δ HK*bb2109*. Los círculos amarillos representan el segundo mensajero c-di-GMP b) Movilidad en agar blando en *B. bronchiseptica* Δ HK*bb2109*. En la parte superior se muestra una foto de los halos obtenidos luego de 18 horas de incubación a 37°C. En el gráfico se muestra el promedio de tres experimentos independientes. (*) y (**) indican significativo con $\alpha=0.05$, prueba t, respectivo al control con pV de cada entorno genético correspondiente.

Estudio del rol de dos posibles sitios de fosforilación en la interacción BB2109-BB4664

La fosforilación de proteínas es una modificación postraduccional que cumple un rol importante en la regulación de distintas funciones celulares en *B. pertussis*²³³. La fosforilación en residuos conservados de aspartato ha sido descrita en numerosos reguladores transcripcionales, y parece ser el mecanismo de activación más común en

los sistemas de dos componentes bacterianos. Esta cascada de fosforilaciones comienza con un sensor transmembrana, que en respuesta a una señal del entorno se autofosforila en un residuo conservado de histidina, para luego transferir ese grupo fosfato a un regulador de respuesta. El sistema BvgAS es un ejemplo de este tipo de sistema y ha sido estudiado en profundidad en *Bordetella*, en donde BvgA, el regulador transcripcional que controla la expresión de los factores de virulencia de la bacteria, es fosforilado por BvgS en el Asp54⁵².

A partir de un análisis bioinformático, se pudo determinar que dentro del dominio HK de BB2109 se encuentra conservada la posición de un residuo de histidina (posición 733). Este análisis se realizó al comparar el dominio HK de BB2109 con el dominio homólogo del sensor histidina quinasa Walk, presente en una gran variedad de bacterias. El residuo His733 sería importante para la fosforilación, lo cual sugiere que la proteína podría autofosforilarse y actuar como quinasa (Tesis de Licenciatura S. Mugni; 2021).

Por otra parte, en un trabajo de proteómica en el cual se analizó el fosfoproteoma de *B. pertussis*²³⁴, BP1092 se encuentra entre las proteínas identificadas. Al analizar el estado de fosforilación, se observa que no se detectó fosfato unido a la Histidina 723 (correspondiente a la histidina 733 de BB2109). Sin embargo, sí se encontró una fosforilación en un residuo de serina en la posición 897 (correspondiente a la serina 908 de BB2109). La fosforilación de residuos de serina ha cobrado relevancia en los últimos años y se han descrito varios ejemplos de su importancia regulatoria²³⁵.

Teniendo en cuenta esto, y de acuerdo a los resultados descritos en la sección anterior, nos propusimos evaluar la importancia de la fosforilación de esos residuos en la regulación de la movilidad a través de la interacción BB2109-BB4664. La estrategia diseñada consistió en realizar mutagénesis sitio-dirigida sobre estos residuos particulares, con el objetivo de reemplazarlos por alanina, un residuo no fosforilable. La lógica detrás de este diseño es que, si la fosforilación en alguno de esos residuos es importante para la interacción funcional observada entre BB2109 y BB4664, la imposibilidad de sufrir esta modificación postraducciona afectaría el fenotipo observado en la movilidad.

Al momento de la escritura de este trabajo de tesis, únicamente se logró obtener la cepa mutante puntual en la serina 908 de BB2109. Para evaluar si la sustitución realizada influye en la capacidad de BB2109 de interactuar con BB4664, se realizó la sobreexpresión de la DGC en la cepa *B. bronchiseptica bb2109*^{S908A}.

Como se muestra en la Figura 5.7, la modificación del residuo de serina 908 no modificó el fenotipo de la sobreexpresión de *bb4664* respecto a la cepa salvaje. Este resultado sugiere que la fosforilación de dicho residuo no es relevante para la relación funcional y posible interacción entre BB4664 y BB2109.

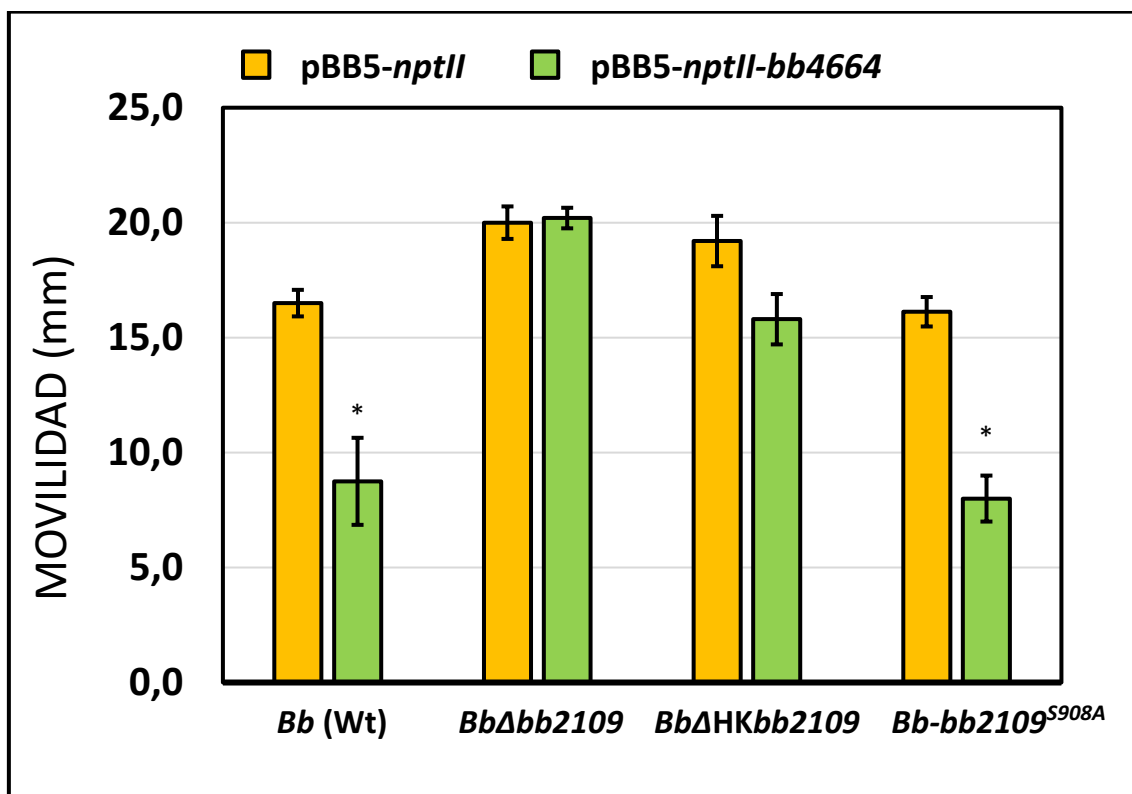


Figura 5.7. Movilidad en *B. bronchiseptica* *bb2109*^{S908A}. Los halos de movilidad fueron medidos 18 horas posterior a la inoculación. En el gráfico se muestra un experimento representativo de 3 realizados. (*) indica diferencia significativa con respecto a la cepa pBB5-*nptII* en cada entorno genético (Prueba t de Student, $p < 0,05$).

Conclusiones y discusión

Los resultados presentados en este capítulo confirman una relación funcional entre BB2109 y BB4664 para regular la movilidad en *B. bronchiseptica*.

Las proteínas duales, que presentan tanto un dominio GGDEF como un dominio EAL en la misma secuencia, pueden o no presentar alguna de las actividades catalíticas asociadas¹⁹⁵. En el caso de BB2109, el análisis de las secuencias correspondientes a los sitios catalíticos de ambos dominios sugiere que no sería capaz de llevar a cabo ni la síntesis ni la degradación de c-di-GMP. Los dominios GGDEF y EAL degenerados, a pesar de ser inactivos catalíticamente, suelen retener la capacidad de unir c-di-GMP. Esto les permite funcionar como efectores de c-di-GMP y responder a concentraciones cambiantes del segundo mensajero. Los resultados descritos en este capítulo, sumados a los ya mencionados para la DGC BdcA⁹⁰, demuestran que BB2109 es capaz de interactuar funcionalmente con más de una DGC, lo que sugiere que podría funcionar como proteína receptora de c-di-GMP proveniente de varias fuentes.

Un escenario posible sería que, ante la activación de BB4664 y la producción de c-di-GMP, esta molécula se uniera a alguno de los dominios degenerados de BB2109, lo que podría derivar en un cambio conformacional que modificaría la actividad de la misma.

La presencia del dominio HK en el C-terminal de BB2109 abre la posibilidad de que el mecanismo por el cual BB2109 regula fenotipos asociados a c-di-GMP esté relacionado a modificaciones en el estado de fosforilación de la proteína, lo que podría afectar el estado de fosforilación de algún regulador de respuesta asociado. En este modelo hipotético, BB2109 actuaría como un sensor histidina quinasa de un sistema de dos componentes, en el cual la señal sería la unión de c-di-GMP. Uno de los indicios que respalda esta hipótesis es la presencia adyacente en el genoma del gen BB2108, para el cual la predicción de dominios con la herramienta CDSearch indica que codificaría para una proteína de la superfamilia OmpR. Este tipo de proteínas consta de un dominio N-terminal que es fosforilado por un sensor histidina quinasa, y un dominio C-terminal que se une al ADN para regular la transcripción de genes blanco²³⁶.

Sin embargo, si la actividad histidina quinasa y su capacidad de transferir el grupo fosfato fuera el único mecanismo involucrado en esta interacción, sería esperable que la delección del dominio HK hubiese abolido por completo la capacidad de BB4664 de inhibir la movilidad. Esto contrasta con la observación de que BB4664 aún es capaz de inhibir la movilidad en ese entorno genético, aunque en una magnitud menor a la inhibición observada en el entorno salvaje.

Al evaluar el posible rol de las fosforilaciones, observamos que la fosforilación en la serina 908 no sería importante en este fenotipo, ya que la sobreexpresión de *bb4664* en la cepa que expresa esta variante de BB2109 indujo una inhibición de la movilidad idéntica a la observada en la cepa salvaje. Sin embargo, la imposibilidad de obtener el mutante puntual en la histidina conservada que podría autofosforilarse, impide completar el estudio de estas posibles fosforilaciones, y terminar de elucidar el mecanismo por el cual BB2109 transmite la señal.

Es interesante destacar que la sobreexpresión de *bb4664* inhibe parcialmente la movilidad, a diferencia de lo observado al sobreexpresar BdcA, donde la inhibición es completa en el entorno salvaje. Esto sugiere que dependiendo de la “fuerza” de la DGC que esté interaccionando con BB2109, el efecto sobre la proteína de membrana y la regulación del fenotipo serán distintos. Se puede pensar que la “fuerza” de BdcA es suficiente para apagar por completo la vía de señalización que culmina en la movilidad, sin embargo, la de BB4664 es menor y por lo tanto presenta un impacto parcial. Esta fuerza no necesariamente tendría que ver con la capacidad de sintetizar más o menos c-di-GMP como tal, sino que también puede depender del número de copias de la

proteína, localización en la membrana, capacidad de interactuar con BB2109 o afinidad de la interacción, entre otros factores.

Por último, es importante remarcar que si bien la movilidad fue utilizada como método de *screening* para evaluar posibles interacciones funcionales de BB2109, no necesariamente debe ser el único fenotipo regulado a través del par BB2109 – BB4664 y por lo tanto tampoco por el par BP1092-BP0338. Como se mencionó anteriormente, BB2109 participa en la regulación de la formación de *biofilm* en conjunto con BdcA en *B. bronchiseptica*. A pesar de que en las condiciones del ensayo de *biofilm* sobreexpresando *bb4664* no fue posible evidenciarlo, no se puede descartar que el par regule ese fenotipo.

La conservación de los actores moleculares de este sistema en *B. pertussis* abre la posibilidad de que también allí funcionen como un par para regular algún fenotipo. Si bien la movilidad ha sido descrita en *B. pertussis*, su rol en la infección, si es que existe, aún no se conoce. Esto sumado a que la expresión de BP1092 se encuentra fuertemente inducida en bacterias recuperadas de macrófagos, sugiere que el par BP1092 – BP0338 podría estar regulando un fenotipo distinto a la movilidad en *B. pertussis*. En el capítulo siguiente utilizamos un enfoque proteómico para identificar procesos que podrían encontrarse regulados por estas proteínas en forma conjunta.

**Capítulo VI:
Estudio
proteómico de la
interacción
BP1092-BP0338
en *B. pertussis***

Introducción

En el capítulo anterior se describió que BB2109 y BB4664 establecen una interacción funcional para regular la movilidad en *B. bronchiseptica*. Estas proteínas presentan homólogos con secuencias prácticamente idénticas en *B. pertussis*: BP1092 y BP0338, respectivamente, por lo que nos propusimos evaluar si estas también funcionan como un par regulatorio en este patógeno.

Como se mencionó anteriormente, hay indicios de que BP1092 podría ser importante para la supervivencia de *B. pertussis* en macrófagos¹⁹¹, lo que sugiere que esta proteína de membrana podría participar en la regulación de la expresión de factores de virulencia necesarios para la infección. Nuestra hipótesis de trabajo es que al igual que en los casos mencionados para *B. bronchiseptica*, BP1092 es necesaria para que la DGC BP0338 esté activa.

Como se describió en el capítulo anterior, el par BB2109-BB4664 participa al menos en la regulación de la movilidad en *B. bronchiseptica*. Si bien este fenotipo está presente en *B. pertussis*, su impacto en el proceso de patogénesis no está aún del todo claro, lo que puede deberse en parte a lo complejo que resulta obtener reproducibilidad en los experimentos con esta bacteria. Sin embargo, hipotetizamos que este par podría estar regulando otros fenotipos, importantes para la infección, que aún no hayan sido descritos. Por lo tanto, para abordar el estudio de esta posible interacción funcional diseñamos una estrategia basada en proteómica comparativa, cuyos resultados principales se describen a continuación.

Construcción de las cepas

Con el objetivo de evaluar si BP1092 participa en la regulación de la expresión de proteínas en *B. pertussis*, se construyó una cepa mutante que presenta la inserción de un plásmido en el marco de lectura correspondiente al gen *bp1092* (BPSM *bp1092*). Dado que BB4664 y BP0338 son prácticamente idénticas a nivel de secuencia de aminoácidos (99,5% de similitud), las proteínas fueron consideradas intercambiables. En base a esta consideración, se utilizó el mismo plásmido diseñado para la sobreexpresión de *bb4664* en *B. bronchiseptica*, para los ensayos en *B. pertussis*. Para facilitar la descripción e interpretación de los resultados en este capítulo se lo llamará pBB5-*nptII-bp0338*.

De esta manera, se dispuso de las cuatro cepas que formaron parte del estudio proteómico: BPSM-pV, BPSM-*pbb0338*, BPSM *bp1092*- pV y BPSM *bp1092*-*pbb0338*.

Obtención de proteínas totales

La obtención de proteínas totales se realizó a partir de cultivos sólidos de las cepas correspondientes. La biomasa bacteriana fue resuspendida en buffer LapA y posteriormente tratada en un homogeneizador con el objetivo de romper las células y permitir que las proteínas sean liberadas a la solución. Seguidamente, las muestras fueron centrifugadas para separar los restos celulares del sobrenadante conteniendo las proteínas totales. Finalmente, se cuantificó la cantidad de proteínas en cada muestra mediante el método de Bradford y se enviaron a analizar por espectrometría de masas²³⁷. Este procedimiento se realizó por cuadruplicado para cada cepa (Ver Materiales y Métodos para una descripción más detallada).

Proteómica comparativa BPSM vs BPSM *bp1092*

El análisis fue realizado en tres etapas: I) Identificación de las proteínas expresadas diferencialmente en la cepa mutante en *bp1092* en condición de c-di-GMP basal; II) Identificación de las proteínas expresadas diferencialmente en la cepa mutante en *bp1092* en condición de sobreexpresión de *bp0338* (alto c-di-GMP). III) Cruce de los resultados entre condiciones para identificar genes regulados específicamente por el par BP1092-BP0338.

Identificación de las proteínas expresadas diferencialmente en la cepa mutante en *bp1092* en condición de c-di-GMP basal

Con el objetivo de identificar proteínas cuya expresión se encuentra regulada por BP1092 se obtuvieron los proteomas de las cepas BPSM-pV y BPSM *bp1092*-pV y se llevó a cabo un análisis de expresión diferencial. Se determinó como línea de corte para estas diferencias un \log_2 del *fold change* de valor absoluto mayor a 1 o menor de -1 y un valor de $-\log(p\text{-value})$ mayor a 1,3. El análisis mostró que 1149 proteínas fueron detectadas en al menos 3 réplicas de cada grupo de muestras.

En la Figura 6.1 se muestra el *volcano plot* que representa la distribución de las proteínas expresadas diferencialmente. En total se identificaron 6 proteínas con expresión disminuida en la cepa mutante en *bp1092* con respecto a la cepa BPSM (Figura 6.1, puntos verdes), mientras que solo se identificaron 2 proteínas con expresión aumentada en el mutante (Figura 6.1, puntos rojos). En la Tabla 6.2 se listan las proteínas expresadas diferencialmente junto con su posible función y/o la presencia de los dominios conservados.

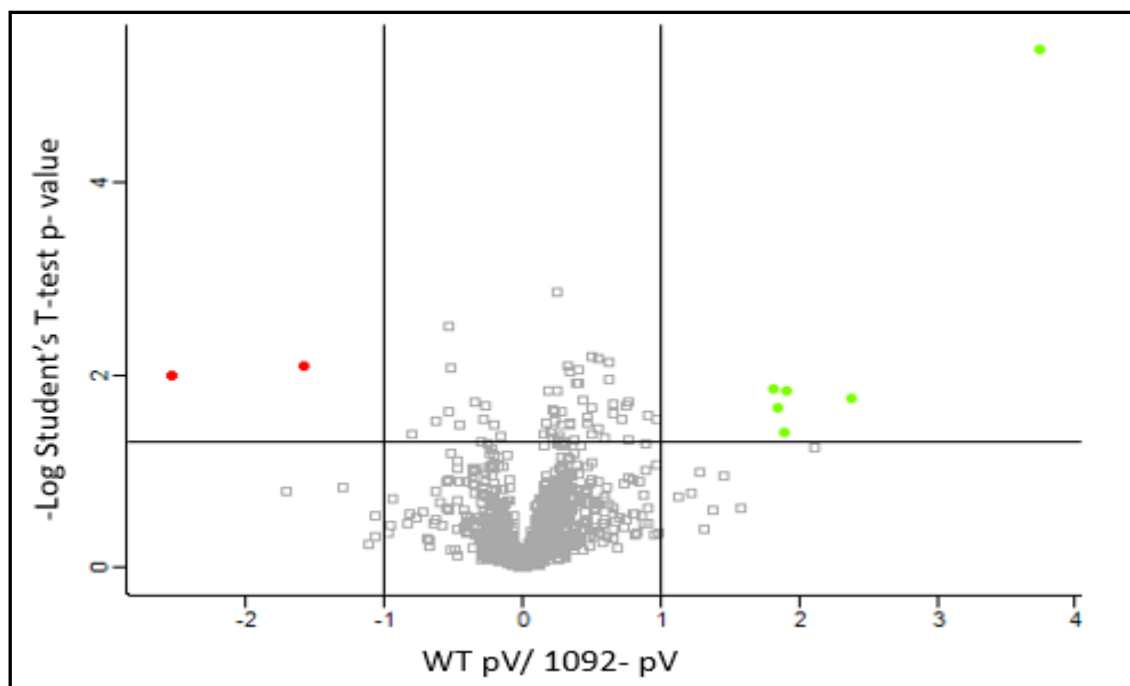


Figura 6.1. Proteínas identificadas en BPSM pV y BPSM *bp1092*-pV. Cada punto representa una proteína identificada en al menos 3 réplicas biológicas de cada cepa, graficadas de acuerdo a sus respectivos $\log_2\text{FoldChange}$ y p-value. Puntos verdes: Proteínas disminuidas en el mutante 1092-/aumentadas en la cepa salvaje. Puntos rojos: Proteínas aumentadas en el mutante 1092-/disminuidas en la cepa salvaje.

Proteína	Dominios Conservados / Posible función	$-\log_2FC$
BP2936	Proteína exportada / Metiltransferasa	3,74
BP1805	IscX – Síntesis de <i>clusters</i> Fe-S	2,37
BP1747	Proteína hipotética	1,92
BP3041	MsrA – Enzima antioxidante	1,89
BP2547	Regulador de respuesta tipo OmpR	1,85
BP3731	Regulador transcripcional	1,81
BP0450	Desconocida	-1,58
BP0388	GmhA – fosfopentosa isomerasa	-2,53

Tabla 6.2. Proteínas expresadas diferencialmente en la comparación BPSM-pV – BPSM *bp1092*-pV. Verde: Proteínas disminuidas en el mutante 1092-/aumentadas en la cepa salvaje. Rojo: Proteínas aumentadas en el mutante 1092-/disminuidas en la cepa salvaje.

La primera observación que surge es que dentro de las proteínas expresadas diferencialmente predominan aquellas cuya expresión se vio disminuida en la cepa mutante en *bp1092*. Esto indicaría que BP1092 regularía la expresión de proteínas principalmente de forma positiva.

Un dato interesante es la menor expresión en el mutante *bp1092*- de dos proteínas involucradas en la resistencia a estrés oxidativo. BP1805 (IscX) es una proteína que

participa en el ensamblado de los *clusters* Fe-S. Estos cofactores son claves para una gran variedad de procesos biológicos básicos (respiración, replicación del ADN, regulación génica, etc), y presentan alta reactividad, lo que los hace susceptibles a la oxidación por O₂ o ROS. En condiciones de estrés oxidativo, la expresión de proteínas relacionada a la síntesis de estos *clusters* se ve aumentada²³⁸. Por otro lado, BP3041 (MsrA - Metionina Sulfóxido Reductasa) evita la inactivación de proteínas por agentes oxidantes. En varias bacterias se ha visto que su expresión se induce en presencia de antibióticos que atacan la pared celular y agentes oxidantes²³⁹. La detección de estas proteínas sugiere que BP1092 podría regular positivamente la expresión de proteínas relacionadas a la resistencia al estrés oxidativo.

Identificación de las proteínas expresadas diferencialmente en la cepa mutante en *bp1092* con alto c-di-GMP

Para evaluar el impacto de la delección de *bp1092* en la expresión de proteínas en un contexto de c-di-GMP elevado, se obtuvieron los proteomas de las cepas BPSM-*pbp0338* y BPSM *bp1092-pbp0338* y se llevó a cabo un análisis de expresión diferencial. En ambas cepas las proteínas reguladas por BP0338 van a estar presentes, pero es esperable observar diferencias en aquellas proteínas reguladas por BP0338 y BP1092 en simultáneo y por aquellas reguladas solo por BP1092. Se determinó como línea de corte para estas diferencias un log₂ del *fold change* de valor absoluto mayor a 1 o menor de -1 y un valor de -Log(p-value) mayor a 1,3. El análisis mostró que 1297 proteínas fueron detectadas en al menos 3 réplicas de cada grupo de muestras.

En la Figura 6.3 se muestra el *volcano plot* que representa la distribución de las proteínas expresadas diferencialmente. En total se identificaron 35 proteínas con expresión disminuida en la cepa BPSM *bp1092-pbp0338* con respecto a la cepa BPSM-*pbp0338* (Figura 6.3, puntos verdes), mientras que solo se identificaron 2 proteínas con expresión aumentada en el mutante (Figura 6.3, puntos rojos). En la Tabla 6.4 se listan las proteínas expresadas diferencialmente.

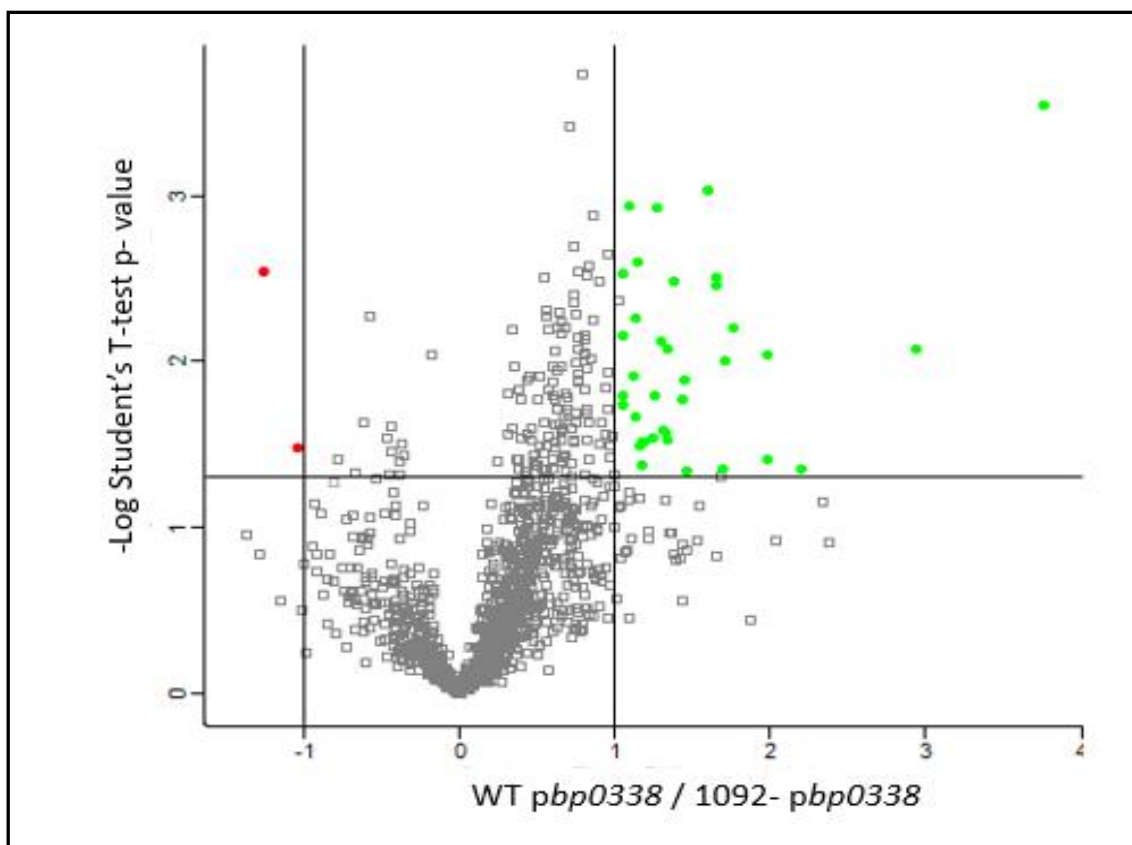


Figura 6.3. Proteínas identificadas en BPSM-*pbp0338* y BPSM *bp1092-pbp0338*. Cada punto representa una proteína identificada en al menos 3 réplicas biológicas de cada cepa, graficadas de acuerdo a sus respectivos \log_2 FoldChange y p-value. Puntos verdes: Proteínas disminuidas en el mutante 1092-/aumentadas en la cepa salvaje. Puntos rojos: Proteínas aumentadas en el mutante 1092-/disminuidas en la cepa salvaje.

Proteína	Dominios Conservados / Posible función	$-\log_2FC$
BP2936	Proteína exportada / Metiltransferasa	3,74
BP3602	Fosfotransferasa /Biosíntesis de azúcares	2,94
BP0802	SecG / Proteína exportadora de membrana	2,21
BP3506	Isocorismatasa	1,98
BP2251	BcrH2 – Chaperona del SST3	1,98
BP1239	Cupina	1,77
BP2750	Lipoproteína	1,70
BP2863	Glioxilasa	1,70
BP3295	Peptidasa	1,68
BP0390	RsmI – metiltransferasa ribosomal	1,66
BP0682	Proteína exportada	1,66
BP2576	Proteína ribosomal 50S L35	1,60
BP2371	PrpD – Metilcitrato deshidratasa	1,47
BP1705	Parte del sistema de transporte TRAP	1,45
BP0433	Regulador transcripcional LysR	1,44
BP1723	Proteína exportada	1,38
BP0160	Regulador de respuesta PhoB	1,35

BP0579	Maleato isomerasa	1,34
BP3061	Desconocida	1,3254
BP1015	Biosíntesis de molibdopterinas	1,31272
BP2924	Proteína exportada	1,30119
BP3080	Proteína de unión a solutos periplasmática	1,2762
BP3012	Proteína de membrana	1,25916
BP2948	RibD – Biosíntesis de riboflavina	1,24248
BP0241	Replicación del ADN	1,1951
BP2951	NrdR – Represor transcripcional	1,1832
BP3816	ZapD – División celular	1,16969
BP2643	Proteína represora regulon G3P - GlpR	1,16122
BP0610	Adenililtransferasa	1,14774
BP1233	Triptófano 2,3 - dioxigenasa	1,13785
BP0128	Proteína de unión a solutos periplasmática	1,13124
BP2280	Sulfotransferasa	1,12351
BP2985	BpH1 - Histona	1,09769
BP3784	Toxina pertussis – Subunidad 2	1,06012
BP3489	Proteína con dominio CinA	1,05807
BP2713	Hidrolasa	1,05184
BP2889	Citocromo C	1,05074
BP2651	Proteína NRDE	1,02
BP3787	Toxina pertussis – Subunidad 3	1,00094
BP3725	Nicotinato-nucleótido defosforilasa	-1,26306
BP1976	Succinato semialdehído deshidrogenasa	-1,03249

Tabla 6.4. Proteínas expresadas diferencialmente en la comparación BPSM-*pbp0338* – BPSM *bp1092*-*pbp0338*. Verde: Proteínas disminuidas en el mutante 1092/aumentadas en la cepa salvaje. Rojo: Proteínas aumentadas en el mutante 1092/disminuidas en la cepa salvaje.

La primera observación que surge de este análisis es que, similar a lo obtenido en la expresión diferencial en el contexto de c-di-GMP basal, la regulación de la expresión de proteínas por BP1092 parece ser principalmente positiva. Por otra parte, el mayor número de proteínas reguladas diferencialmente con respecto a la condición anterior, sugiere que la importancia regulatoria de BP1092 es más significativa en la condición de alto nivel de c-di-GMP.

Un dato interesante es la coincidencia de BP2936 como la proteína con la mayor magnitud de cambio en ambos análisis. Se trata de una metiltransferasa que modifica ácidos grasos cuya expresión se ve activada por el sistema BvgAS, por lo que se cree que podría tener un rol en la infección. Sin embargo, en estudios *in vivo* tanto en modelos celulares como animales, no se pudo evidenciar su rol biológico²⁴⁰. El hecho de que esta proteína se vea regulada positivamente en ambas condiciones de análisis sugiere que su expresión estaría regulada por BP1092 en forma independiente de los niveles de la expresión de BP0338 o los niveles globales de c-di-GMP.

Dentro del grupo de proteínas diferencialmente expresadas también resulta interesante la detección de BcrH2, una chaperona del SST3, y dos subunidades de la toxina *pertussis*. Este resultado constituye el primer indicio que conecta a BP1092 con la regulación de proteínas importantes para la virulencia de *B. pertussis*.

Por último, también vale la pena mencionar la detección de cuatro reguladores transcripcionales (BP0433, NrdR, GlpR y PhoB), lo que sugiere que BP1092 podría modificar la expresión de proteínas de manera indirecta a través de la modificación de los niveles de expresión de estos factores.

Búsqueda de proteínas reguladas por el par BP1092-BP0338

Con el diseño experimental descrito, se obtuvieron dos análisis de expresión diferencial independientes para la comparación entre la cepa salvaje (BPSM) y la cepa mutante en *bp1092* (BPSM *bp1092*⁻). Las proteínas que nos resultan de interés para profundizar en nuestro modelo de trabajo son aquellas que sean reguladas por BP1092 de forma dependiente de BP0338. Para ello, se contrastaron los datos de ambos análisis para encontrar proteínas que se vieran modificadas en la condición de sobreexpresión de BP0338 (*pbp0338*), pero no en la condición basal (pV). Resulta importante destacar que en este tipo de ensayos la ausencia de detección de una proteína en una condición dada no necesariamente significa que ésta no se esté expresando. Por lo tanto, sólo fueron considerados como resultados válidos en este análisis aquellas proteínas que se encuentran diferencialmente expresadas en la condición de sobreexpresión y, además, fueron detectadas en la condición basal, aunque sin expresión diferencial. En la Tabla 6.5 se enumeran las proteínas que cumplen con estas condiciones, con su correspondiente *Fold Change* en ambas condiciones y la predicción de dominios/función por el servidor CD-Search.

Proteína	Dominios conservados/ Posible función	$-\log_2FC$ (WT/1092-) <i>pbp0338</i>	$-\log_2FC$ (WT/1092-) pV
BP2251	BcrH2 / Chaperona de sistema de secreción tipo III	1,97	0,74
BP2576	Proteína ribosomal	1,59	0,05
BP1705	Transportador periplasmático	1,45	0,25

BP0433	Regulador transcripcional tipo LysR	1,44	0,04
BP1723	Proteína exportada/ Sin dominios conservados	1,38	0,75
BP0160	Regulador de respuesta PhoB	1,35	-0,28
BP2924	Proteína integral de membrana/Función desconocida	1,30	0,36
BP3080	Proteína de membrana / Unión de iones metálicos	1,28	-0,12
BP3012	Proteína de unión a sustratos aromáticos/Periplasma	1,26	0,51
BP2948	Biosíntesis de riboflavina	1,24	0,25
BP3816	Proteína ZapD / División celular	1,17	0,66
BP0610	Adenililtransferasa/ Biosíntesis de molibdopterinas	1,15	0,17
BP0128	Proteína de unión a sustrato/ Transportador ABC	1,13	-0,03
BP2280	Sulfotransferasa	1,12	0,91
BP2985	Histona	1,1	0,3
BP3784	Toxina pertussis – Subunidad 2	1,06	0,31
BP3489	Proteína inducida por competencia/ Familia CinA	1,06	0,19
BP2713	Hidrolasa	1,05	0,4
BP2889	Citocromo	1,05	0,45
BP3725	Biosíntesis de NAD	-1,26	-0,94

Tabla 6.5. Proteínas diferencialmente expresadas en la condición de sobreexpresión de *bp0338* y detectadas sin cambios en la condición basal. Verde: Activadas por BP1092 de forma dependiente de BP0338. Rojo: Reprimidas por BP1092 de forma dependiente de BP0338.

Proteínas asociadas a la virulencia reguladas por el par BP1092-BP0338

Dentro del grupo de proteínas reguladas por BP1092 en forma dependiente de BP0338, se identificaron 3 proteínas asociadas a la virulencia. Todas ellas son reguladas en forma positiva por BP1092 en ese contexto. A continuación, se describe cada una de ellas:

La proteína codificada por el gen BP2251, BcrH2, es una chaperona del sistema de secreción tipo III (SST3), uno de los principales factores de virulencia de *B. pertussis*.

Su expresión está regulada positivamente por el sistema de dos componentes BvgAS⁵³, y dos estudios de transcriptoma *in vivo* independientes lo identificaron como un gen con expresión aumentada en el modelo murino^{56,192}. Las chaperonas favorecen la estabilización de sus proteínas blanco y previenen que éstas interactúen con otros factores durante su almacenamiento previo a la secreción²⁴¹. Nogawa y colaboradores describieron la interacción física de BcrH2 con las proteínas del SST3 BopD y BopN, que forman parte del complejo estructural que dirige la traslocación de efectores a través de este sistema hacia el interior de la célula eucariota²⁴².

La proteína codificada por el gen BP3784 (*ptxB*) corresponde a la subunidad 2 de la toxina pertussis, una toxina de tipo AB₅ secretada por *B. pertussis*. Es una de las subunidades B de la proteína, que cumplen la función de anclaje y unión a los receptores presentes en la membrana de las células del sistema inmune. Su expresión se encuentra regulada positivamente por el sistema de dos componentes BvgAS⁵³.

Por su parte, la proteína codificada por el gen BP1723 ha sido identificada previamente en un estudio proteómico de bacterias recuperadas de macrófagos (Tesis H. Cafiero; 2018), con una expresión aumentada con respecto a un control que no tuvo contacto con este tipo celular, lo que sugiere que podría cumplir algún rol en la supervivencia intracelular. Esta proteína no posee dominios conservados identificables, pero sí un péptido señal, lo que permite asociar su localización al periplasma. Su expresión no se encuentra regulada por el sistema de dos componentes BvgAS⁵³.

Otra proteína interesante que surge de este análisis es el regulador de respuesta PhoB, codificado por el gen BP0160, cuya expresión no se encuentra regulada por el sistema de dos componentes BvgAS⁵³. Como antecedente, su transcripto ha sido identificado como regulado positivamente en un ensayo de transcriptómica con bacterias recuperadas de pulmón, lo que sugiere que podría ser importante en el proceso de infección¹⁹². Este regulador de respuesta responde a los niveles de fosfato inorgánico (P_i) en otras bacterias. En condiciones limitantes de P_i, como las que enfrentan las bacterias al colonizar el pulmón, es fosforilado por el sensor histidina quinasa PhoR, lo cual favorece su interacción con el ADN y la inducción de la expresión de genes asociados a la homeostasis de P_i²⁴³. Sin embargo, esta no sería su única función ya que se ha visto que PhoB puede ser activado por otras proteínas histidina quinasa para regular la expresión de otros genes. Por ejemplo, Pratt y colaboradores demostraron que PhoB en *V. cholerae* (60% identidad con la proteína de *B. pertussis*) es capaz de unirse al promotor y reprimir la expresión del regulador transcripcional TcP/H en *V. cholerae*, lo que a su vez se traduce en una menor expresión de la toxina colérica²⁴⁴.

Las proteínas BP0128, BP3012, BP3080 y BP1723 son proteínas relativamente pequeñas, que de acuerdo a su secuencia son secretadas. Las cuatro presentan

homología en general y en su extremo N terminal se observa un péptido señal consenso, lo que podría indicar que son secretadas por el mismo sistema de secreción.

La porción C terminal no presenta consenso con dominios conocidos por lo que resulta difícil predecir su función.

Conclusiones y discusión

En el presente capítulo se muestran los resultados de dos experimentos de proteómica comparativa independientes, donde se identificaron proteínas expresadas diferencialmente en una cepa mutante en *bp1092* con respecto a una cepa salvaje de *B. pertussis*, en diferentes contextos de abundancia de c-di-GMP.

El análisis realizado en la condición de c-di-GMP basal muestra que el número de proteínas reguladas exclusivamente por BP1092 es relativamente bajo. La identificación de dos proteínas que estarían relacionadas a la resistencia a estrés oxidativo como reguladas positivamente por BP1092, sugiere que esta proteína de membrana podría participar en la defensa de *B. pertussis* contra este tipo de estrés. Como se mencionó anteriormente, hay indicios de que BP1092 sería importante para la sobrevivencia de *B. pertussis* en células de macrófagos¹⁹¹. Considerando que en ese contexto las bacterias se ven expuestas a la producción de distintos agentes oxidantes producidos por las células para lograr su eliminación, es probable que *B. pertussis* regule a través de BP1092 mecanismos que favorezcan su resistencia o su adaptación a este entorno.

El análisis de los *volcano plot* de ambos experimentos permite observar a simple vista que la mayor parte de las proteínas diferenciales se encuentran con expresión disminuida en la cepa mutante en *bp1092*, es decir, serían proteínas cuya expresión es regulada positivamente por esta proteína de membrana. En paralelo, también existe la posibilidad de que BP1092 modifique la expresión de estas proteínas de forma indirecta, al controlar los niveles de expresión de reguladores transcripcionales. En la condición de c-di-GMP basal se encuentran con expresión disminuida los reguladores transcripcionales BP2547 y BP3731; y en la condición de alto c-di-GMP los reguladores BP0433, NrdR, GlpR y PhoB.

Un hallazgo interesante es que el número de proteínas expresadas diferencialmente aumenta considerablemente en el contexto de sobreexpresión de *bp0338*, lo que indicaría que BP1092 en esa condición es más relevante para la regulación de la expresión de proteínas. Como se mencionó anteriormente, esta proteína podría ser un receptor de c-di-GMP. Una explicación posible para esta observación es que en un contexto de abundancia de c-di-GMP, se favorece la unión de BP1092 al segundo

mensajero y esto modifica su capacidad de participar en las vías de señalización que culminan con la expresión de proteínas.

Por último, se contrastaron los análisis proteómicos realizados en cada condición de c-di-GMP para poder identificar proteínas que fueran reguladas por BP1092 en forma dependiente de BP0338. Al estudiar la interacción funcional entre BP0338 y BP1092 surge la incógnita de si BP0338 se encuentra presente *in vivo* para interactuar con BP1092 durante la infección. El transcripto correspondiente a *bp0338* fue identificado como regulado positivamente *in vivo* (modelo murino) con respecto a *in vitro*, lo que sugiere que esta proteína se expresaría en un contexto de infección⁵⁶. Esta observación también permite inferir que la copia genómica de *bp0338* no se estaría expresando en las condiciones de nuestro experimento proteómico, lo que descartaría que en las cepas que portan el plásmido vacío haya expresión de BP0338 y, por lo tanto, interacción con BP1092. Esta idea se ve reforzada por la ausencia de detección de péptidos correspondientes a BP0338 en los proteomas de las cepas salvaje y mutante portando el plásmido vacío. Adicionalmente, otros investigadores observaron que la transcripción de *bp0338* no se encuentra regulada por el sistema de dos componentes BvgAS⁵³. Por otra parte, también es posible considerar que la disponibilidad de BP0338 para sintetizar cdG y/o interactuar con BP1092 podría depender de algún tipo de regulación no relacionada a su expresión. Es muy común que las DGC se vean sometidas a regulación postraduccional, como la interacción con otra/s proteínas o la unión de algún ligando específico que module su actividad¹²⁴.

La identificación de dos factores fuertemente asociados a la virulencia de *B. pertussis*, como la toxina pertussis y BcrH2, sugiere que BP1092 podría estar activando la expresión de proteínas necesarias en algún momento del proceso de infección. El hallazgo de una proteína del SST3 (BcrH2) regulada positivamente por BP1092 en alto c-di-GMP puede relacionarse con resultados obtenidos en nuestro laboratorio que indican que un aumento en los niveles globales de c-di-GMP en *B. bronchiseptica* inhibe la expresión de genes del SST3⁸⁹. En la proteómica, la expresión de BcrH2 se encuentra disminuida en la cepa mutante en BP1092 en comparación a la cepa salvaje. Es interesante destacar que esta expresión diferencial sólo ocurre cuando se sobreexpresa *bp0338*, mientras que un contexto de c-di-GMP basal no se observan diferencias. Por lo tanto, este resultado sugiere que c-di-GMP podría participar en la regulación de la expresión de BcrH2 por BP1092.

Dado que tanto BcrH2 como la toxina pertussis son factores activados por BvgAS, una posible hipótesis es que pudiera existir una activación de BvgA a través de BP1092. Otro mecanismo posible podría tener que ver con la activación del regulador de respuesta putativo BP1091, adyacente a BP1092 y que posee un dominio REC y un

dominio de unión a ADN. A pesar de los indicios que sugieren que podrían formar un sistema de dos componentes, esta relación funcional no ha sido demostrada experimentalmente.

Estas posibles regulaciones cruzadas entre proteínas que participan de la homeostasis del c-di-GMP con sistemas de dos componentes y reguladores transcripcionales, formando un sistema regulatorio mucho más complejo y que es capaz de responder a diferentes señales del entorno, ha sido descrito en otras bacterias, como se ha desarrollado a lo largo de este trabajo de Tesis. El estudio detallado de estas regulaciones queda como perspectivas futuras.

Capítulo VII: Conclusiones generales y discusión

Los dinucleótidos cíclicos son moléculas de señalización involucradas en el control de diversos procesos celulares en bacterias. Dentro de ellos se encuentra el c-di-GMP, que se ha visto implicado en la regulación de una gran variedad de fenotipos: formación de *biofilm*, movilidad, control del ciclo celular, virulencia, entre otros.

En nuestro laboratorio nos dedicamos a estudiar el rol de este segundo mensajero bacteriano en la regulación de fenotipos asociados a la virulencia en el género *Bordetella*. Este género bacteriano incluye un grupo de especies conocidas como “*Bordetellas* clásicas”, que son capaces de causar infecciones respiratorias en mamíferos. En los últimos años, utilizando como modelo a *B. bronchiseptica*, hemos podido describir el rol de c-di-GMP en la regulación de la transición entre vida planctónica y formación de *biofilm*, así como también su implicancia en la regulación de la expresión del SST3 y la sobrevivencia en células del sistema inmune^{85,89,90}.

B. pertussis es un patógeno respiratorio exclusivo de los seres humanos. El análisis comparativo de los genomas de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* muestra que comparten varias de las proteínas involucradas en la síntesis y degradación del segundo mensajero c-di-GMP, lo que sugiere que podría haber vías regulatorias conservadas entre ambas especies. Por otra parte, también hay proteínas que sólo se expresarían en *B. bronchiseptica* y no en *B. pertussis*, y viceversa.

Para iniciar el estudio de la regulación por c-di-GMP en *B. pertussis*, nos centramos en el estudio de BP1492, una posible DGC que nos resultó de particular interés debido a que es la única proteína de este tipo que se encuentra en *B. pertussis*, pero no en el resto de las “*Bordetellas* clásicas”. El análisis del dominio GGDEF de esta proteína sugiere que sería capaz de sintetizar c-di-GMP, ya que presenta conservados los residuos necesarios para la coordinación del sustrato y la catálisis. Se llevaron a cabo numerosos experimentos para demostrar experimentalmente esta actividad, en los cuales se sobreexpresó la proteína en distintos sistemas experimentales basados en la regulación ya conocida de c-di-GMP sobre la movilidad y la formación de *biofilm* en distintos organismos. La actividad DGC pudo ser evidenciada a través de la sobreexpresión heteróloga de *bp1492* en *E. coli* y *B. bronchiseptica*, observando inhibición de movilidad y aumento de la formación de *biofilm*, respectivamente. Sin embargo, también se observó que, en varios sistemas experimentales, como la movilidad en *B. bronchiseptica* y la formación de *biofilm* en *P. fluorescens* Δ 4DGC, la sobreexpresión de *bp1492* no produjo el resultado esperado para una DGC activa. Este constituyó el primer indicio de que, si bien BP1492 puede en ciertas condiciones aumentar c-di-GMP e impactar en fenotipos regulados por este segundo mensajero, su actividad parece ser baja o no encontrarse siempre activada.

La evaluación de BP1492 en su entorno natural *B. pertussis* mostró que esta proteína no modificó la formación de *biofilm* al ser sobreexpresada. Adicionalmente, tampoco se observaron diferencias en este fenotipo al interrumpir el gen *bp1492*. Esto podría deberse a que el rol BP1492 en *B. pertussis* no esté asociado a la regulación del *biofilm*. Cabe destacar que *B. pertussis* no forma un *biofilm* robusto en condiciones de laboratorio, por lo que pequeños cambios pueden resultar difíciles de observar.

Por otra parte, BP1492 ha sido detectada en trabajos de transcriptómica y proteómica como una proteína que se expresa *in vivo*^{191,192}, pero no ha sido detectada en condiciones de cultivo *in vitro* como los utilizados en este trabajo para la evaluación de la formación de *biofilm*. Por lo tanto, es probable que las condiciones ensayadas no representen las condiciones que BP1492 se encuentre al ser expresada *in vivo*. La capacidad de BP1492 de sintetizar c-di-GMP podría depender de la interacción de esta proteína con un factor o factores que solamente se expresan *in vivo*, lo que explicaría la falta de actividad aparente en nuestros ensayos. Adicionalmente, la actividad catalítica de BP1492 probablemente se encuentre regulada *in vivo* por su dominio GAF N-terminal. Esto podría ocurrir a través de la interacción con otra/s proteína/s o la unión de ligandos específicos que modifiquen el estado oligomérico de la proteína. La falta de estos efectores o ligandos en las condiciones de cultivo ensayadas podrían ser otro de los factores que impiden evidenciar la actividad de esta DGC en *B. pertussis*. También es importante resaltar que el aumento de la formación de *biofilm* por la sobreexpresión de una DGC activa aún no ha sido descrito en *B. pertussis*, a diferencia de lo ya mencionado para *B. bronchiseptica*. A pesar de que sería esperable que, al igual que en su congénere, el aumento de c-di-GMP intracelular se traduzca en un aumento en la capacidad formadora de *biofilm*, también es posible que la regulación de este fenotipo en *B. pertussis* difiera de lo observado para *B. bronchiseptica*.

El antecedente de que la expresión de BP1492 fue hallada aumentada en bacterias recuperadas de macrófagos nos llevó a pensar que esta proteína podría participar de alguna manera en la adaptación del patógeno a la vida intracelular. Considerando que para establecerse intracelularmente *B. pertussis* debe enfrentar distintos tipos de estrés ambiental relacionados a mecanismos de defensa de las células hospedadoras, nos propusimos en primer lugar evaluar si BP1492 se encuentra involucrada en la resistencia al estrés oxidativo y el estrés ácido. Adicionalmente, ya existen reportes que asocian a proteínas relacionadas al metabolismo de c-di-GMP con la resistencia a estos tipos de estrés^{224,245} (Tesis K. Belhart; 2022).

La delección de *bp1492* no impactó en la capacidad de la bacteria de sobrevivir al estrés oxidativo inducido por el agregado de agua oxigenada, pero si a la capacidad de sobrevivir a un pH bactericida. Este resultado podría tener posibles implicancias

biológicas, debido a que ha sido reportado que *B. pertussis* se aloja en fagosomas que se acidifican una vez internalizada en la célula hospedadora ²²⁵. En el mismo sentido, estudios con la DGC BdcB de *B. bronchiseptica* mostraron que un mutante en esta proteína presenta menor resistencia a un pH bactericida, similar a lo observado para BP1492. (Tesis K. Belhart; 2022). Por lo tanto, es posible pensar que BP1492 y c-di-GMP podrían participar en la resistencia a las condiciones ácidas generadas por el entorno y contribuir de esta manera a evitar la eliminación del patógeno por la célula hospedadora.

Para explorar esta posibilidad, se realizó un ensayo de infección de células A549 con la cepa *bp1492*- y se evaluó la capacidad de este mutante de invadir y sobrevivir en este tipo celular a dos tiempos distintos luego de la infección. Sin embargo, en las condiciones evaluadas por nosotros, no se observaron diferencias en comparación a lo observado para la cepa salvaje, lo que parece indicar que la delección de *bp1492* no afecta este fenotipo. Es posible que, como se ha descrito para otros fenotipos regulados por c-di-GMP, la actividad de BP1492 pudiera ser compensada *in vivo* por alguna de las otras DGC que se encuentran codificadas en el genoma de *B. pertussis*.

En resumen, los resultados presentados en esta tesis apoyan la hipótesis de que BP1492 es una DGC activa. El hecho de que el gen *bp1492* haya sido incorporado al genoma en forma posterior a la divergencia evolutiva con el ancestro común de las *Bordetellas* clásicas, y su conservación en la población circulante de *B. pertussis*, nos induce a pensar que esta proteína podría participar en alguna etapa del proceso de infección o la transmisión de este patógeno. Esta hipótesis se ve reforzada por la detección de su expresión *in vivo* en condiciones de interacción con el hospedador. Sin embargo, en esta tesis no se obtuvieron evidencias que confirmen la importancia biológica de BP1492. Como perspectivas en este sentido, sería interesante profundizar en la relación de esta DGC con la resistencia a estrés ácido, las posibles implicancias de la regulación de este fenotipo por c-di-GMP y su importancia para la interacción de *B. pertussis* con el hospedador. Por otro lado, se podría evaluar la posibilidad de utilizar otros modelos *in vivo* que permitan obtener información acerca del posible rol biológico de BP1492.

En la segunda parte de este trabajo de tesis nos enfocamos en otra proteína asociada al metabolismo de c-di-GMP en *B. pertussis*. La proteína BP1092 posee tanto un dominio GGDEF como un dominio EAL, aunque ambos se encuentran degenerados. Esto significa que no es esperable que esta proteína presente las actividades ciclasa o fosfodiesterasa correspondientes. La capacidad de estos dominios degenerados de

conservar su capacidad de unión de c-di-GMP y actuar como efectores moleculares en vías de señalización que involucran este segundo mensajero ha sido demostrada experimentalmente en varios sistemas.

En *B. bronchiseptica*, nuestro grupo de trabajo ha descrito el rol de la proteína LapD, que presenta un dominio EAL degenerado, en la regulación de la formación de *biofilm*. Esta proteína interactúa físicamente con la DGC BdcA para regular la localización en membrana de la adhesina LapA, una de las principales responsables de la formación de *biofilm* en esta bacteria (Tesis N. Ambrosi; 2018). Adicionalmente, también se ha demostrado que esta DGC presenta una dependencia funcional con BB2109 para regular la movilidad y la formación de *biofilm*⁹⁰. Si bien esta dependencia no pudo ser asociada experimentalmente a una interacción física directa entre estas proteínas, resulta lógico pensar que BdcA podría interactuar con más de una proteína EAL degenerada para regular distintos fenotipos. Esta evidencia acumulada sugiere que la interacción entre proteínas con dominios EAL degenerados y proteínas con dominios GGDEF sería un mecanismo regulatorio bastante común y que podría haber otras proteínas que actuaran por mecanismos similares.

Al haber identificado la relación funcional entre BB2109 y BdcA y su relevancia para la regulación de la formación de *biofilm* y la movilidad en *B. bronchiseptica*⁹⁰, surgió la incógnita de si la proteína homóloga en *B. pertussis* (BP1092) podría estar participando en la regulación de algún proceso asociado a c-di-GMP de forma similar a como lo hace LapD. El hecho de que BP1092 y BB2109 sean 100% idénticas nos sugiere que podrían presentar interacciones moleculares conservadas entre ambas especies y participar en mecanismos regulatorios idénticos. La evidencia de que la proteína BP1092 sería importante para la vida intracelular de *B. pertussis* en macrófagos¹⁹¹ nos lleva a pensar que debe estar cumpliendo algún rol biológico en ese contexto, y esto podría deberse a su capacidad de unir c-di-GMP proveniente de una DGC. Sin embargo, la búsqueda en el genoma de *B. pertussis* mostró que no existen homólogos de la proteína BdcA, lo que sugiere que, si efectivamente BP1092 interactúa *in vivo* con una DGC, esta debería ser otra.

La aplicación de una serie de criterios de exclusión nos llevó a proponer como candidata a interactuar con BP1092 a la DGC codificada por el gen *bp0338*. Debido a que en *B. pertussis* aún no se dispone de fenotipos que se encuentren claramente asociados a c-di-GMP, la evaluación de esta posible interacción funcional fue realizada con el par homólogo BB2109-BB4664 en *B. bronchiseptica*. La identidad a nivel de secuencia de este par con el correspondiente en *B. pertussis* nos llevó a asumir que, si era posible identificar una relación funcional en *B. bronchiseptica*, sería válido extrapolarla a su congénere.

Para evaluar la actividad del par BB2109-BB4664 (homólogas de BP1092-BP0338) se realizaron experimentos que permitieron demostrar que existe una relación de función entre estas proteínas. Una observación interesante es que la interacción de BdcA con BB2109 regula la formación de *biofilm* y la movilidad, mientras que la interacción con BB4664 solo regula la movilidad. Por otro lado, resultados de nuestro laboratorio sugieren que otras DGC no actúan a través de BB2109 (BdcB, BB2626), por lo que se puede descartar que todas las regulaciones dependientes de c-di-GMP estén relacionadas con BB2109. Esto sugiere que las interacciones observadas para estas dos DGC son específicas.

En cuanto al mecanismo por el cual la interacción entre estas proteínas participaría en la transducción de una señal, la hipótesis más probable implica una interacción física. Es probable que las actividades DGC de BdcA y BB4664 sólo se vean activadas cuando estas proteínas interactúan con BB2109. En esas condiciones, la DGC produciría c-di-GMP en las cercanías de BB2109, que podría responder a estos cambios locales en la concentración del segundo mensajero gracias a la unión del mismo a alguno de sus dominios degenerados. Este mecanismo sería similar al descrito para la interacción de LapD con distintas DGC en *Pseudomonas* para regular la formación de *biofilm*^{159,184}. Sin embargo, debido a las dificultades enfrentadas a la hora de evidenciar experimentalmente esta interacción física, esta hipótesis aún no ha podido ser demostrada.

La presencia del dominio HK en BB2109 (homóloga de BP1092) sugiere que su participación en las vías de señalización podría estar relacionada a su capacidad de transferir un grupo fosfato a un regulador de respuesta. Su delección indujo una disminución en la inhibición de la movilidad mediada por BB4664, demostrando que este dominio participaría en la transducción de la señal. Un posible mecanismo podría incluir la fosforilación del regulador de respuesta putativo BB2108 (homóloga de BP1091), cuya presencia adyacente a BB2109 en el genoma sugiere que ambas proteínas podrían componer un sistema de dos componentes. En este modelo, BB2108 sería el factor involucrado en los cambios transcripcionales que culminan con la inhibición de la movilidad producto de la interacción de BB2109 con las DGC.

Otra observación que surge de los resultados obtenidos con BB4664 (homóloga de BP0338) es la diferencia en la magnitud de la inhibición de movilidad de esta DGC en comparación a la inhibición inducida por BdcA. La primera de ellas inhibe la movilidad un 50% al ser sobreexpresada en el entorno salvaje, mientras que BdcA lo hace en un 100%. Adicionalmente, BB4664 no afecta la formación de *biofilm*, mientras que BdcA sí⁹⁰. Considerando el modelo de trabajo descrito en el párrafo anterior, es posible que la afinidad de la interacción DGC-BB2109 (homóloga de BP1092) sea distinta para cada

DGC particular y eso se traduzca en diferentes niveles de actividad del dominio HK y por lo tanto diferencias en la fosforilación del regulador de respuesta BB2108 (homóloga de BP1091).

Por lo tanto, hasta este punto, proponemos que la actividad de BP0338 está regulada por su interacción con BP1092. En esta activación, intervendría el dominio HK aunque no siendo indispensable su presencia.

Más allá de que sólo pudo evidenciarse la actividad de BB4664 (homóloga de BP0338) dependiente de BB2109 (homóloga de BP1092) a través de la movilidad, no se puede descartar que este par de proteínas también se encuentre regulando otros procesos asociados a c-di-GMP, como podría ser el SST3 o la resistencia a algún tipo de estrés, fenotipos ya descritos en otros patógenos asociados a este segundo mensajero, incluida *B. bronchiseptica*⁸⁹.

Por lo tanto, en la última parte de este trabajo nos propusimos volver al modelo de *B. pertussis* y evaluar el impacto que tiene la interacción funcional entre BP1092 y BP0338 en la regulación de procesos asociados a la patogénesis. La movilidad de *B. pertussis* es una característica que se encuentra en estudio, aunque actualmente se desconoce si cumple algún rol en el proceso de infección. Este patógeno ha sido históricamente considerado como no móvil, aunque recientemente hemos descrito, junto a otros investigadores, que *B. pertussis* puede expresar el flagelo y moverse en ciertas condiciones^{189,246}. Sin embargo, debido al elevado costo de los reactivos necesarios para la realización de los experimentos de movilidad en esta bacteria, y sobre todo a los problemas de reproducibilidad que presenta la técnica, esta metodología para evidenciar la interacción funcional entre BP1092 y BP0338 no fue abordada en este trabajo de Tesis.

A fin de tener un panorama más global de proteínas que se encontraran reguladas por este par, se adoptó un enfoque proteómico con el objetivo detener indicios concretos de qué procesos celulares y fenotipos podrían verse regulados por el mismo.

En primer lugar, es interesante destacar el hallazgo de dos proteínas involucradas en la resistencia a estrés oxidativo en la condición de c-di-GMP basal. Este indicio abre la posibilidad de que la importancia de BP1092 para la sobrevivencia en macrófagos se deba, al menos en parte, a la adaptación de *B. pertussis* a las condiciones bactericidas del entorno.

Al comparar las proteínas con expresión diferencial entre las distintas condiciones de c-di-GMP, se observó que BP1092 no parece regular la expresión de muchas proteínas por sí sola, pero sí en conjunto con BP0338. Esto puede deberse a que en esas

condiciones la unión de c-di-GMP a BP1092 sea máxima y por lo tanto también lo sea la activación de la transducción de la señal.

La toxina pertussis es un factor de virulencia exclusivo de *B. pertussis*, ya que no es expresada por ninguna otra especie del género. El hecho de que una de las subunidades proteicas que la compone se encuentra disminuida en el mutante BPSM *bp1092* cuando BP0338 está presente, sugiere que este par podría estar favoreciendo la expresión de uno de los factores de virulencia principales de *B. pertussis*, y constituye un indicio que relaciona a c-di-GMP con la virulencia de este patógeno.

En el mismo sentido se encuentra regulada la chaperona del SST3 BcrH2, de la familia de SycD/LcrH. Recientemente, Li y colaboradores han descrito el rol de SicA, una chaperona de *S. enterica* perteneciente a la misma familia que BcrH2, en la regulación de la expresión y estabilidad de los efectores del SST3. Brevemente, SicA interacciona tanto con un regulador transcripcional para activar la transcripción de estos genes, así como también directamente con los efectores de SST3 SipB y SipC para estabilizarlos previo a su secreción. Estas interacciones se ven inhibidas cuando SicA une c-di-GMP. Este trabajo representa una novedosa descripción de uno de los mecanismos por el cual c-di-GMP estaría regulando negativamente el SST3, así como también la descripción de una nueva familia de efectores de c-di-GMP²⁴⁷. Nuestro laboratorio ha descrito que un aumento en los niveles globales de c-di-GMP en *B. bronchiseptica* inhibe la expresión de genes del SST3, lo que se traduce en menor citotoxicidad y virulencia atenuada en el modelo murino⁸⁹. Estos dos antecedentes podrían ser importantes para explicar cuál podría ser el mecanismo por el cual el par BP1092-BP0338 regula la expresión de proteínas. Es posible pensar que BP0338 solo es capaz de aumentar los niveles de c-di-GMP cuando interacciona con BP1092, similar a lo reportado por nuestro grupo para la interacción entre BdcA y BB2109⁹⁰. El c-di-GMP generado por BP0338 podría ser unido por la proteína BcrH2 e inhibir su interacción con los efectores BopD y BopN, importante para la formación del complejo que dirige la secreción a través del SST3 de *B. pertussis*²⁴². Alternativamente, dado que BcrH2 se une a los efectores y los estabiliza en el citoplasma, es posible que su mayor producción se relacione con una mayor permanencia de los mismos en el citoplasma y por lo tanto una menor exportación al exterior para formar parte de la jeringa del SST3.

A partir de los resultados presentados en este trabajo de Tesis proponemos que c-di-GMP posee un rol en el proceso de infección, controlando la expresión de algunos factores de virulencia y la resistencia al pH ácido.

Si bien resulta muy interesante que *B. pertussis* presente una DGC exclusiva y conservada, no hemos podido determinar su rol específico en la patogénesis. Sin

embargo, hemos dado los primeros pasos en su caracterización y proponemos un posible rol en la resistencia al pH intracelular de las células del sistema inmune.

Por otro lado, hemos contribuido al conocimiento general de los mecanismos de regulación que responden a c-di-GMP. El sistema compuesto por una proteína dual de membrana que es capaz de interactuar con otras DGC ha sido descrito a la par de este trabajo de Tesis en *P. fluorescens* y *B. bronchiseptica*^{91,119}. La confirmación de la existencia del par regulador BP1092-BP0338 confirma que es éste un mecanismo de regulación común en los sistemas de c-di-GMP.

Finalmente, proponemos como nueva hipótesis a contrastar en el futuro que BP1092 actuaría como una proteína nodal en el sistema de regulación por c-di-GMP encargada de reclutar diferentes DGC, entre ellas BP0338. La sinergia entre ambas proteínas permitiría regular diferentes factores de virulencia en *B. pertussis* y es por eso que BP1092 se encontraría sobreexpresada durante su vida intracelular. También proponemos que BP1492 es una DGC activa, sensible a algún metabolito intracelular. En respuesta a este metabolito desconocido, sentido por el dominio GAF de BP1492, la DGC se activaría y permitiría la persistencia dentro del hospedador en algún tipo de célula de la respuesta inmune. La descripción de estos mecanismos no solo aporta al conocimiento de los mecanismos de regulación en los que está involucrado este segundo mensajero en las bacterias en general, sino a la comprensión de nuevos mecanismos involucrados en la patogénesis de *B. pertussis*.

Capítulo VIII: Materiales y métodos

Organismos utilizados

Escherichia coli

Se utilizó la cepa DH5 α para la propagación de los distintos plásmidos recombinantes generados en este trabajo. Esta cepa permite utilizar la técnica de selección blanco-azul en el caso de que el plásmido clonado sea compatible con la misma.

Para la introducción de plásmidos en bacterias del género *Bordetella* por conjugación bacteriana se utilizó la cepa S17-1 (λ pir)²⁴⁸.

Para los ensayos de movilidad se transformó por electroporación a la cepa S17-1 con los plásmidos pMQ72 vacío y pMQ72-*bp1492*.

Bordetella pertussis

La cepa de *B. pertussis* utilizada en el desarrollo de este trabajo fue la denominada BPSM. La misma es una cepa genéticamente idéntica a la cepa de referencia Tohama I, pero con una resistencia a estreptomycin generada en el laboratorio. Todos los mutantes y cepas sobreexpresantes utilizadas se construyeron a partir de dicha cepa.

CEPA	Descripción	Referencia
BPSM	Derivada de Tohama I, resistente a estreptomycin	206
BPSM-pV	BPSM pBBR1-MCS5-nptII	Este trabajo
BPSM- <i>pbp1492</i>	BPSM pBBR1-MCS5-nptII- <i>bp1492</i>	Este trabajo
BPSM- <i>pbp0338</i>	BPSM pBBR1-MCS5-nptII- <i>bp0338</i>	Este trabajo
BPSM <i>bp1492</i> -	Inserción de pk18mob en el marco de lectura del gen <i>bp1492</i>	Este trabajo
BPSM <i>bp1092</i> -	Inserción de pk18mob en el marco de lectura del gen <i>bp1092</i>	Este trabajo
BPSM <i>bp1092</i> -pV	Mutante <i>bp1092</i> - conjugada con plásmido pBBR1-MCS5-nptII	Este trabajo
BPSM <i>bp1092</i> - <i>pbp0338</i>	Mutante <i>bp1092</i> - conjugada con plásmido pBBR1-MCS5-nptII- <i>bp0338</i>	Este trabajo

Bordetella bronchiseptica

CEPA	Descripción	Referencia
Bb salvaje	<i>B. bronchiseptica</i> 9.73 (cepa salvaje)	249
Bb-pV	<i>B. bronchiseptica</i> 9.73 que porta el plásmido pBBR1MCS-5-nptII (pBB5)	250
Bb- <i>pbdcB</i>	Sobreexpresa la DGC BdcB de <i>B. bronchiseptica</i>	Cepario laboratorio
Bb- <i>pbb4664</i>	Sobreexpresa la DGC BB4664 de <i>B. bronchiseptica</i>	Este trabajo

Bb-pbp1492	Sobreexpresa la DGC BP1492 de <i>B. pertussis</i>	Este trabajo
Bb-pZ-1492	Sobreexpresa la proteína de fusión Zip-GDEF1492	Este trabajo
Bb Δ bvgR-pV	Mutante deletional en <i>bvgR</i>	Tesis MP. Gutiérrez, 2021
Bb Δ bvgR-pbp1492	Bb Δ bvgR sobreexpresando <i>bp1492</i>	Este trabajo
Bb Δ bb2109	Mutante insercional en el ORF <i>bb2109</i>	90
Bb Δ bb2109-pV	Δ bb2109 portando el plásmido pBB5	90
Bb Δ bb2109-pbb4664	Δ bb2109 que sobreexpresa la DGC BB4664 de <i>B. bronchiseptica</i>	Este trabajo
Bb Δ HKbb2109	Delección limpia de la región codificante del dominio HK de BB2109	Este trabajo
Bb Δ HKbb2109-pV	Δ HK2109 portando el plásmido pBB5	Este trabajo
Bb Δ HKbb2109-pbb4664	Δ HK2109 que sobreexpresa la DGC BB4664 de <i>B. bronchiseptica</i>	Este trabajo

Pseudomonas fluorescens y *Pseudomonas aeruginosa*

CEPA	Descripción	Referencia
Pf Δ 4DGC	<i>PfΔwspRΔgcbAΔgcbBΔgcbC</i>	173
Pf Δ 4DGC-pMQ72	<i>PfΔwspRΔgcbAΔgcbBΔgcbC</i> pMQ72	173
Pf Δ 4DGC-pgcbC	<i>PfΔwspRΔgcbAΔgcbBΔgcbC</i> pMQ72-gcbC	173
Pf Δ 4DGC-pbp1492	<i>PfΔwspRΔgcbAΔgcbBΔgcbC</i> pMQ72-bp1492	Este trabajo
PA14		251
PA14-pV	PA14 pMQ72	Este trabajo
PA14-pbp1492	PA14 pMQ72-bp1492	Este trabajo

Cepas y antibióticos

Cepas	Gentamicina (μ g/ml)	Kanamicina (μ g/ml)	Estreptomina (μ g/ml)
<i>E. coli</i>	10	25	-
<i>P. fluorescens</i>	30	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	50	-	-
<i>B. bronchiseptica</i>	50	80	200
<i>B. pertussis</i>	30	25	200

Técnicas de biología molecular

Preparación de ADN plasmídico (miniprep)

Los plásmidos fueron obtenidos por la técnica de lisis alcalina (miniprep) descrita por Green y Sambrook²⁵². Esta técnica se utilizó para recuperar plásmidos a partir de suspensiones bacterianas tanto de *E. coli* como de *B. bronchiseptica*. Para la purificación del ADN plasmídico se utilizó sílica, según la técnica descrita por Boyle²⁵³.

10 µl de una suspensión de sílica se agregaron al sobrenadante de la lisis alcalina, se mezcló vigorosamente y se centrifugó durante 10 segundos a máxima velocidad. La sílica se lavó dos veces con 300 µl de solución de lavado de sílica y se dejó secar a temperatura ambiente. Para desprender el ADN de la sílica se resuspendió el pellet en 40 µl de agua bidestilada, se calentó durante 5 minutos en un baño a 65°C, se centrifugó durante 3 minutos a 10000 rpm y el sobrenadante conteniendo el ADN plasmídico se transfirió a un tubo limpio.

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

Cuantificación de ADN

La concentración de las preparaciones de ADN se analizó por la medida de absorbancia a 260 nm utilizando un equipo Nanodrop ND1000 (Thermo Fisher).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

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

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

Para cada reacción de PCR se utilizaron las cantidades de primers, enzima, ADN molde, dNTPs y Mg²⁺ sugeridas por el fabricante de la enzima. Las condiciones de ciclado a utilizar fueron determinadas para cada reacción ensayando un gradiente de temperatura en la etapa de hibridación y eligiendo aquella temperatura que brindó el mejor resultado. Dado que el genoma de las bacterias del género *Bordetella* presentan un alto porcentaje de G-C (68,07%), se agregó dimetilsulfoxóidio (DMSO) en una concentración final de 3% v/v en aquellas preparaciones de PCR en las que se utilizó ADN de *Bordetella* como molde. El agregado de DMSO previene la formación de estructuras secundarias del ADN y disminuye la temperatura de *melting* de las reacciones.

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

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

Electroforesis en gel de agarosa

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

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

Secuenciación de ADN

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

Digestión por enzimas de restricción

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

Ligaciones

Las reacciones de ligación con la enzima ADN ligasa T4 se llevaron adelante siguiendo las indicaciones de los proveedores (Promega, New England BioLabs). Generalmente,

las reacciones de ligación se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente o durante 16 horas a 4°C. En todos los casos, la relación molar de inserto:vector utilizada fue de 3:1.

Células electrocompetentes de *E. coli* y electroporación

Para la preparación de células electrocompetentes de *E. coli* se siguió la técnica de Tung y Chow²⁵⁴. Se inocularon 250 ml de medio LB líquido sin NaCl con 500 µl de un cultivo de la cepa de *E. coli* de interés (S17-1 o DH5α) crecido durante 16 horas en medio LB líquido sin NaCl. El cultivo se incubó a 37°C con agitación de 160 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ = 0,6-0,8 unidades. El cultivo se colocó en hielo por 15 minutos y a partir de ese momento, todo el proceso se continuó en frío. Las células se centrifugaron a 4000 g por 15 minutos a 4°C y se lavaron dos veces con 100 ml de glicerol estéril 10% v/v. Finalmente, las células se resuspendieron suavemente en 1 ml de solución de glicerol estéril 10% v/v y se fraccionaron en alícuotas de 50 µl que fueron conservadas a -80°C hasta su utilización. La eficiencia de transformación se determinó antes de que las células electrocompetentes fueran utilizadas para un ensayo, siendo el valor mínimo aceptable 10⁶UFC/ng ADN.

Las electrotransformaciones de las células *E. coli* electrocompetentes se realizaron en un equipo Gene Pulser BioRad y en cubetas de 0,2 ml bajo las condiciones recomendadas por el fabricante (25 mF, 200 W, 2,5 kV). Las ligaciones habitualmente se llevaron a cabo mediante el uso de membranas de acetato de celulosa y se electroporaron 10 µl de las mismas. En los casos en que las ligaciones no fueron desaladas se utilizaron 1-5 µl para electroporar. Tras la electrotransformación se adicionó inmediatamente 1 ml de LB líquido estéril a las células y éstas fueron incubadas a 37°C durante una hora, a fin de permitir la expresión de la proteína asociada a la resistencia a antibiótico codificada en el plásmido incorporado. Por último, las células fueron plaqueadas en medio LB selectivo y se incubaron 24 horas a 37°C.

Clonación por recombinación *in vivo* en levaduras

Para la construcción de vectores basados en pMQ30 y pMQ72 (ver Anexo II) se utilizó una técnica de clonado que aprovecha los mecanismos de reparación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, diseñada por Shanks y colaboradores²⁵⁵.

En primer lugar, se obtuvieron los fragmentos a clonar, diseñando los *primers* de tal manera que posean en sus extremos 5' y 3' secuencias de homología con los plásmidos pMQ72 y pMQ30. En paralelo, se realizó una digestión del plásmido receptor con la enzima de restricción SmaI. A continuación, se preparó una mezcla que contiene

levadura, el plásmido receptor digerido, ADN de esperma de salmón simple cadena y los fragmentos a clonar.

La levadura se obtuvo realizando un cultivo *overnight* en medio YPD, del cual se tomaron 500 μ l, se lavaron con Buffer TE, y se resuspendieron en 500 μ l de medio *Lazy Bones*. Luego se adicionaron 20 μ l de ADN de esperma de salmón (previamente hervido por 10 minutos), 200 ng del vector digerido y 30 μ l del fragmento de PCR a clonar. Luego de agregados todos los componentes, se mezcló con vórtex por 2 minutos y se incubó durante 72 horas a temperatura ambiente.

Transcurrida la incubación, se realizó un shock térmico de 10 minutos a 42°C para favorecer la introducción del material genético en la levadura. A continuación, se centrifugaron las células, se lavaron con 500 μ l de Buffer TE, se volvieron a resuspender en 100 μ l de Buffer TE y se plaquearon en medio URA⁻. Estas placas fueron incubadas entre 3 y 5 días hasta la aparición de colonias. Las levaduras que crezcan serán aquellas que hayan incorporado y ensamblado el plásmido. El mismo porta el gen URA3, que les permite a las levaduras crecer en un medio sin uracilo.

Por último, se llevó a cabo la extracción de los plásmidos recombinantes utilizando un kit comercial de miniprep, con algunas modificaciones. La totalidad de la biomasa de levaduras fue resuspendida en agua destilada estéril, centrifugada y resuspendida en solución P1 del kit. Se adicionaron 200 μ l de solución P2 y 200 μ l de perlas de vidrio de 0,5 mm, para favorecer la ruptura de las células. Se agitó en vórtex y luego se incubó a 4°C durante 5 minutos. A continuación, se adicionaron 350 μ l de buffer P3 frío, se mezcló varias veces por inmersión y se centrifugó durante 10 minutos a 11000 g. Finalmente, se siguieron las instrucciones del kit para el lavado y resuspensión final del plásmido. En esta suspensión puede haber más de un plásmido diferente como resultado de la recombinación en levaduras, por lo que se utiliza para transformar *E. coli* electrocompetentes y chequear PCR las colonias obtenidas.

Conjugación en *Bordetella*

La cepa de *Bordetella* aceptora fue cultivada en agar BGA-sangre suplementado con estreptomicina por 72 horas. A continuación, fue repicada en agar BGA-sangre-estreptomicina e incubada por 24 horas.

Por su parte, 24 horas antes de la conjugación se realizó un aislamiento de la cepa donadora *E. coli* S17-1 suplementada con el antibiótico correspondiente. La misma fue incubada durante 16 horas, tras lo cual se tomó biomasa de esta placa para inocular 5 ml de medio LB líquido suplementado con el antibiótico correspondiente. Este cultivo se incubó durante 6 horas con agitación de 160 rpm.

Para la conjugación, la biomasa obtenida en la placa de *Bordetella* fue resuspendida en medio SS y se realizó una centrifugación de 5 minutos a 2500 g con posterior resuspensión en SS para el lavado del antibiótico remanente. Un procedimiento similar se siguió con 1 ml del cultivo de la cepa donora para eliminar el LB y antibiótico residuales. Luego de estos lavados, en un tubo nuevo se mezclaron partes iguales de cepa donora y aceptora, se centrifugó 5 minutos a 2500 g y se eliminó el sobrenadante. La mezcla de bacterias fue resuspendida en 50 μ l de SS y se sembró en forma de gota en una placa de BGA-sangre sin antibiótico previamente espatulada con 50 μ l de $MgCl_2$ 2,0 M, que luego fue incubada 16 horas a 37°C. La biomasa de la gota de conjugación fue resuspendida en 1 ml de SS, se realizaron diluciones seriadas 1/10 y se plaquearon en medio BGA-sangre suplementado con estreptomina y el antibiótico correspondiente al plásmido transferido. La incubación de las placas se realizó a 37°C, hasta la aparición de colonias transconjugantes, tiempo que varía según la especie (*B. bronchiseptica*: 2 o 3 días; *B. pertussis*: 3 a 5 días).

Obtención de mutantes en *B. bronchiseptica*

Para la delección limpia de genes en *B. bronchiseptica*, se llevó a cabo un intercambio alélico utilizando sacarosa como agente de selección negativa²⁵⁶. Dos fragmentos adyacentes al gen, de 400 pares de bases de longitud, fueron clonados en el vector pMQ30, suicida en *Bordetella*. El mismo fue introducido en *B. bronchiseptica* por conjugación bacteriana y se seleccionaron los clones recombinantes con gentamicina. Los clones obtenidos fueron evaluados en su sensibilidad a sacarosa a través de un repique paralelo en medio TYE y TYE-Sac (concentración final de sacarosa= 11%), donde aquellos que tuvieran afectada su capacidad o su velocidad de crecimiento en el medio con sacarosa fueron seleccionados para continuar con el protocolo. A partir de un único clon recombinante se estableció un cultivo líquido de 5 mL en medio SS sin antibiótico, con el objetivo de favorecer las condiciones para que se produzca un segundo evento de recombinación homóloga. Tras una incubación de toda la noche, se prepararon diluciones de 10^{-1} a 10^{-6} y se plaquearon en paralelo en placas con medio TYE y TYE-Sac. En este paso de selección, solo serán capaces de crecer en sacarosa aquellos clones que hayan perdido el plásmido que se encontraba integrado en su genoma. Luego de este segundo paso de recombinación se puede recuperar el genotipo salvaje o el genotipo mutante, por lo que se realizó un chequeo por PCR (ver *Primers*) y a continuación se mandó a secuenciar.

Obtención de mutantes en *B. pertussis*

Para la interrupción del marco de lectura correspondiente al gen *bp1492* se clonó un fragmento interno del mismo en el plásmido pK18mobSacB, un vector no replicativo en el género *Bordetella*. A continuación, el plásmido fue introducido en *B. pertussis* por conjugación utilizando la cepa *E. coli* S17-1 y se seleccionaron clones recombinantes cultivando a las bacterias en BGA suplementado con kanamicina, antibiótico para el cual confiere resistencia el plásmido utilizado. Por último, la recombinación fue confirmada por PCR.

Una estrategia análoga fue utilizada para la interrupción de los marcos de lectura correspondientes a los genes *bp0338* y *bp1092*.

Ensayo de supervivencia a estrés oxidativo

Para la evaluación de la resistencia a estrés oxidativo, se utilizó como punto de partida un inóculo sólido. La biomasa de las placas correspondientes a cada cepa fue resuspendida en medio SS y se preparó un inóculo de $DO=3 \times 10^5$ UFC/ml. Se colocó 1 ml de inóculo en un tubo *ependorf* de 1,5 ml y se agregó agua oxigenada comercial para alcanzar una concentración final de H_2O_2 de 0,1 mM. En ese momento, una alícuota fue tomada para determinar la cantidad de bacterias iniciales. A continuación, se incubó durante 1 hora a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se realizaron diluciones seriadas de cada tubo y se plaquearon por cuadruplicado en forma de gota en una placa de BGA sangre con el antibiótico correspondiente. Cada cepa fue ensayada por duplicado. Las colonias tardaron entre 72 y 96 horas en aparecer y poder ser contadas.

Se calculó un índice de supervivencia utilizando:

El promedio de los cuatro valores obtenidos para cada cepa en el recuento previo a la incubación con H_2O_2 , corregido por el factor de dilución.

El promedio de los cuatro valores obtenidos para cada cepa en recuento posterior a la incubación con H_2O_2 .

La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$\% \text{Supervivencia} = \left(\frac{\text{UFC promedio luego de la incubación} \times \text{factor de dilución}}{\text{UFC promedio inicial} \times \text{factor de dilución}} \right) * 100$$

Ensayo de supervivencia a estrés ácido

Para la evaluación de la resistencia a estrés ácido, se utilizó como punto de partida un inóculo sólido. La biomasa de las placas correspondientes a cada cepa fue resuspendida en medio SS y se preparó un inóculo de $DO=3 \times 10^5$ UFC/ml. Se tomó 1 ml del mismo, se centrifugó y se resuspendió en 1 ml SS pH=4 o SS pH=7 (control), en un tubo *ependorf* de 1,5 ml. En ese momento, una alícuota fue tomada para determinar la cantidad de bacterias iniciales. A continuación, se incubó durante 2 horas a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se realizaron diluciones seriadas de cada tubo y se plaquearon por cuadruplicado en forma de gota en una placa de BGA sangre con el antibiótico correspondiente. Cada cepa fue ensayada por duplicado. Las colonias tardaron entre 72 y 96 horas en aparecer y poder ser contadas.

A partir de los valores de UFC/ml de cada tubo, se calculó el \log_{10} UFC/ml. A continuación, se promediaron los valores de las réplicas biológicas y se graficaron.

Curvas de crecimiento

Para la construcción de las curvas de crecimiento se utilizó como punto de partida un inóculo líquido. A partir del mismo se establecieron cultivos en *erlenmeyers* de las cepas a ensayar con $DO_i=0,3$, en los medios correspondientes: SS (pH=7,4), a modo de control y SS (pH=5,2) como medio ácido. Los cultivos se incubaron durante 30 horas a 37°C y 160 rpm de agitación. Se obtuvieron medidas de DO_{650} a las 3, 5, 7, 9 y 25 horas. Para cada medida se calculó el $\log_{10}DO_{650}$ y se graficó $\log_{10}DO_{650}$ en función del tiempo.

Para la construcción de las curvas de crecimiento de forma automatizada, se utilizó un lector de microplacas BMG LABTECH. A partir de un cultivo *overnight* de las cepas a ensayar, se prepararon inóculos en SS (pH=7,4) y SS (pH=6), con $DO_{600i}=0,25$. Se sembraron 100 μ l en un pocillo de placa de ELISA de 96 pocillos, por cuadruplicado para cada cepa en cada condición. La placa se incubó durante 24 horas a 37°C, y se programó la toma de una muestra cada 60 minutos. Finalmente, se graficaron los datos de DO_{600} en función del tiempo.

Ensayos de formación de *biofilm*

Para los experimentos de *biofilm* en superficie abiótica se utilizaron placas multipocillo de PVC de 96 wells (Corning 96 Well Clear PVC Assay Microplate, Sigma-Aldrich). A lo largo de este trabajo se llevaron a cabo experimentos de este tipo en distintos organismos: *B. bronchiseptica*, *B. pertussis* y *P. fluorescens*, cada uno de ellos con

consideraciones particulares que responden al proceso de formación de *biofilm* de cada uno.

B. bronchiseptica

Se realizaron aislamientos de las cepas a ensayar en agar BGA sangre, suplementado con el antibiótico correspondiente según el plásmido en caso de ser necesario, y se incubaron en estufa por 72 horas a 37°C. Colonias hemolíticas aisladas se repicaron a una placa de agar SS-sangre suplementado con el antibiótico correspondiente y se incubó por 48 horas adicionales. La biomasa obtenida transcurrido este tiempo fue resuspendida en 1 ml de medio líquido SS y se midió la DO_{650} , como punto de partida para preparar una solución de trabajo de $DO_{650}=1$. Por último, 100 μ l de esta suspensión fueron trasvasados a un tubo conteniendo 900 μ l de medio SS (suplementado o no con AN según las condiciones de cada experimento), obteniendo una suspensión de $DO_{650}=0,1$, que fue sembrada de a 100 μ l por pocillo. Este procedimiento se realizó por cuadruplicado para cada cepa en cada condición a ensayar. La placa sembrada se incubó a 37°C durante 24 horas, tras lo cual se cuantificó la formación de *biofilm* por tinción con cristal violeta.

B. pertussis

Se realizaron aislamientos de las cepas a ensayar en agar BGA sangre, suplementado con el antibiótico correspondiente según el plásmido en caso de ser necesario, y se incubaron en estufa por 72 horas a 37°C. La biomasa obtenida en esta placa fue repicada a dos placas de BGA sangre e incubada 24 adicionales. Transcurrido este período, se resuspendió la biomasa en 1 ml de medio líquido SS y a partir de aquí se procedió de idéntica manera a lo descrito en el apartado anterior para *B. bronchiseptica*, excepto por dos variables: la DO inicial fue de 0,2 el tiempo de incubación fue de 72 horas. Transcurrido ese tiempo, se cuantificó la formación de *biofilm* por cristal violeta.

P. fluorescens

Se realizaron aislamientos de las cepas a ensayar en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente (30 μ g/ml para mantenimiento y expresión del pMQ72). Se inocularon 5 ml de medio LB con una colonia aislada proveniente de la placa y se incubó toda la noche a 28°C y 160 rpm de agitación. Posteriormente se midió la DO_{600} de los cultivos y se preparó una suspensión de trabajo de $DO_{600}=1$, en medio K10T-1, suplementado con arabinosa 0,1 % para la inducción del plásmido pMQ72. A continuación, se trasvasaron 100 μ l a un tubo conteniendo 900 μ l de K10T-1 suplementado y se sembraron 100 μ l de esa suspensión en un pocillo de la placa de 96

pocillos. Este procedimiento se realizó por cuadruplicado para cada cepa. El *biofilm* se incubó durante 6 horas, a 28°C y sin agitación. Transcurrido este tiempo se procedió a la cuantificación del *biofilm* por cristal violeta.

Tinción con cristal violeta

En todos los casos, los *biofilms* formados fueron cuantificados por tinción con cristal violeta, con modificaciones menores respecto a lo reportado previamente²⁵⁰.

En primer lugar, se descartaron las suspensiones bacterianas de cada pocillo y se realizaron 3 lavados de los mismos con agua destilada. Seguidamente, se realizó un paso de fijación que consistió en la incubación en estufa a 37°C durante 10 minutos. A continuación, se adicionó en cada pocillo 125 µl de cristal violeta 0,1% y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, se retiró el colorante y se realizaron lavados con agua destilada para eliminar los restos del mismo no adheridos al pocillo. En este momento, los *biofilms* pueden visualizarse a simple vista y se toman registros fotográficos.

Para poder cuantificar los *biofilms* formados se solubilizó el colorante a través de la adición de 150 µl de ácido acético 33% v/v a cada uno de los pocillos. Finalmente, se tomaron 100 µl de cada pocillo y cuantificó la absorbancia a 595 nm.

Ensayos de movilidad

E. coli

Para evaluar la movilidad tipo swimming en *E. coli*, se llevaron a cabo ensayos de movilidad en agar blando. Se prepararon placas de LB con el agregado de una concentración baja de agar (0,3%).

Las cepas a ensayar fueron cultivadas en agar LB suplementado con el antibiótico correspondiente y se incubaron 24 horas a 37°C. Colonias aisladas en esas placas fueron tomadas con un palillo de madera y sembradas en una placa de agar blando. A continuación, las placas inoculadas se incubaron durante 24 horas a 37°C, tras lo cual se midieron los halos de movilidad de cada cepa.

B. bronchiseptica

Para evaluar la movilidad tipo swimming de las cepas de *B. bronchiseptica*, se llevaron a cabo ensayos de movilidad en agar blando.

Las placas de movilidad fueron preparadas a partir del medio líquido SS, con el agregado de una concentración baja de agar (0,3%), para que al solidificarse se obtenga una consistencia tal que permita que las bacterias puedan moverse en el medio.

Además, las placas fueron suplementadas con el antibiótico correspondiente (en caso de ser necesario) y sulfato de magnesio (MgSO_4) 40 mM. La inoculación se realizó a partir de una única colonia aislada en una placa de SS-sangre (+antibiótico), utilizando un palillo de madera para transferir la biomasa a la placa de movilidad introduciendo el palillo en un punto determinado, intentando no llegar al fondo de la placa.

Transcurridas 18 horas de incubación a 37°C, las placas fueron observadas, fotografiadas y se midieron los halos de movilidad desarrollados.

Ensayos de infección en células A549

La línea celular de epitelio alveolar humano A549 se cultivó en MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) a 37°C en CO_2 5%. Para los ensayos de infección, las células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos, en un 80% de confluencia. La MOI utilizada fue de 100 bacterias por célula.

Se inocularon placas de BGA sangre a partir de los stocks bacterianos correspondientes y se incubaron durante 72 horas a 37°C. Se realizaron repiques a una nueva placa de BGA sangre y se incubó durante 24 horas. A continuación, se resuspendió la biomasa bacteriana y se prepararon los inóculos de 3×10^7 UFC/ml en medio MEM+10%SFB. (Para *Bordetella* $\text{DO}_{650}=1$ equivale a 3×10^9 UFC/ml).

Luego del agregado de las bacterias, las células fueron incubadas durante 2 horas para permitir la adhesión e invasión. A continuación, se lavó 3 veces con PBS para eliminar el exceso de bacteria y se agregó medio MEM suplementado con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Polimixina B. Se incubó por 1 hora. Transcurrido ese tiempo se descartó el medio de cultivo, se lavó 3 veces con PBS para eliminar el exceso de antibiótico y se reemplazó por medio fresco sin antibiótico. Se incubó durante 3 o 24 horas más y se realizó la lisis para recuperar las bacterias que hubiesen ingresado y sobrevivido dentro de las células. Esto se llevó a cabo utilizando 100 μl por pocillo de una suspensión de Tripsina+EDTA e incubado durante 5' a 37° 5% CO_2 .

Se realizaron diluciones 1/5; 1/10 y 1/100 y se realizó el recuento en placas de BGA sangre por el método de la gota. Las colonias tardaron entre 3 y 5 días en aparecer.

Proteómica comparativa

Se realizaron aislamientos de las cepas a ensayar en placas de BGA-sangre suplementadas con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Gentamicina, y se incubaron durante 72 horas. Transcurrido ese tiempo, para cada réplica biológica se repicó la biomasa de una placa a cinco placas nuevas de idéntica composición, y se incubó durante 24 horas

adicionales. Este procedimiento se realizó por cuadruplicado para cada una de las cepas a ensayar.

La biomasa obtenida en las cinco placas se resuspendió en 500 μ l de Buffer LapA, con el agregado de 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), con el objetivo de proteger a las proteínas de la degradación tras la lisis celular.

La lisis se realizó utilizando un homogeneizador de tejidos Precellys 24 Homogenizer (Bertin Technologies). Para ello, la biomasa resuspendida se trasvasó a un tubo compatible con dicho equipo, conteniendo además 50 mg de perlas de vidrio para favorecer la lisis bacteriana. Se realizaron 6 pulsos de un programa que consta de 2 fases homogenización de 20 segundos, con un tiempo de descanso de 10 segundos entre fases. Luego de cada pulso, el equipo tiene un tiempo de espera de 2 minutos, durante los cuales las muestras se conservaron en hielo. Seguidamente, se centrifugó a 7500 g durante 15 minutos a 4°C, para separar las perlas de vidrio y los restos celulares del lisado celular. Los sobrenadantes conteniendo las proteínas fueron trasvasados a un tubo de microcentrífuga nuevo.

La cantidad de proteínas en los sobrenadantes obtenidos se cuantificó por el método de Bradford²³⁷.

Las muestras obtenidas fueron sembradas en un gel de poliacrilamida (12,5% acrilamida-bisacrilamida). Las mismas fueron corridas a 100 V aproximadamente hasta que hubiesen ingresado 1 cm en el gel de separación. De esta manera se logra que las proteínas totales queden contenidas en una porción muy pequeña de gel. En ese momento, la corrida fue interrumpida y el gel fue teñido con Solución de Coomassie coloidal G-250, hasta ver la aparición de bandas. Seguidamente, las bandas conteniendo las proteínas totales fueron cortadas y transferidas a un tubo de microcentrífuga, donde se guardó a -20°C hasta el momento de su envío para el análisis por espectrometría de masas (Unidad de Espectrometría de Masas – Instituto de Biología Molecular y Celular – Rosario, Argentina).

Se realizó un análisis de cuantificación relativa (LFQ, Label-free Quantitation). Los fragmentos de geles enviados fueron tratados de acuerdo al protocolo de Link y LeBaer²⁵⁷ y sembrados en un espectrómetro de masa Q-Extractive HF. La separación de péptidos se realizó en un nanoHPLC Ultimate3000 equipado con una nanocolumna C18 de 50 cm (ES903, Thermo).

Se generó un archivo en formato RAW. Los datos fueron analizados en MaxQuant (V: 2.1.4.00), utilizando como base de datos la correspondiente a la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I (Uniprot código: UP000002676).

El análisis estadístico se realizó con el software Perseus (V: 1.6.25). Fueron incluidas en el análisis de expresión diferencial únicamente las proteínas detectadas en las 4

réplica biológicas de cada condición, que presentaran un valor de *-log Student's p-value* mayor a 1,3 y cuyo valor de *Fold Change* en base logarítmica fuera mayor a 1 en valor absoluto.

ANEXO I: Medios de cultivo y soluciones utilizadas

Medios de cultivo:

BGA

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

SS (Stainer-Scholte)

Glutamato de sodio	570 mM
L-prolina	20 mM
NaCl	530 mM
KH ₂ PO ₄	36 mM
KCl	20 mM
MgCl ₂ .6H ₂ O	5 mM
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,4 mM
Tris-HCl	120 mM
pH	7,20
Agar (para medio sólido)	15 g/l

LB (Lysogeny broth):

Triptona	10 g/l
NaCl	5 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
Agar (para medio sólido)	15 g/l

Complemento para medio de cultivo SS (1000X)

L-cisteína	4% p/v
FeSO ₄ .7H ₂ O	1% p/v
Ácido ascórbico	2% p/v
Ácido nicotínico	0,4% p/v

Complemento para medio de cultivo SS (100X)

Complemento 100X	1 ml
Glutación reducido	100 mg
Agua destilada	9 ml

URA3-

YNB	6,7 g/l
CSM	0,76 g/l

Glucosa	15 g/l
Agar	20 g/l

YPD (Yeast extract-Peptone-Dextrose)

Peptona	20 g/l
Extracto de levadura	10 g/l
Glucosa	20 g/l
Agar (para medio sólido)	15 g/l

TYE (Tryptone yeast extract)

Triptona	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
Agar (para medio sólido)	15 g/l

TYE-Sac (Tryptone yeast extract – Sacarosa 11% v/v)

Triptona	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
Agar (para medio sólido)	15 g/l
Sacarosa	11 % v/v

K10T-1

Triptona	20% p/v
Glicerol	20% v/v
MgSO ₄	1 M
K ₂ HPO ₄	1 M
Tris-HCl	1 M
pH	7,40

Soluciones:**Miniprep**

Solución P1	
Tris-HCl	50 mM
EDTA	10 mM
pH	8,00
Solución P2A	
NaOH	0,1 mM
Solución P2B	
SDS	1% p/v
Solución P3	
Acetato de potasio	1,5 M
pH	5,5

Suspensión de sílica

Sílica	2,0 g
Agua destilada	15,0 ml

Solución de lavado de sílica 10X

NaCl	50 mM
Tris-HCl	10 mM
EDTA	2,5 mM
pH	7,5

Solución de lavado de sílica 1X

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

Solución de Coomassie coloidal G-250**Para 100 ml:**

Coomassie Blue G-250	0,12 g
HPO ₃ 85%	11,8 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g
Agua destilada	Hasta 80 ml
Metanol	20 ml gota a gota

Solución Lazy Bones

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

Buffers:**Buffer fosfato PBS**

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

Buffer TE

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

Buffer TBE (10X)

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

Buffer de corrida para SDS-PAGE

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

Buffer Laemmli 4X

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

Buffer LapA

Tris	20 mM
MgCl ₂	10 mM
pH	8,0

ANEXO II: Plásmidos utilizados

Nombre	Uso	Referencia
pK18mob-sacB	Subclonado / Mutaciones insercionales en <i>Bordetella</i>	
pK18mob-sacB-SR1092	Inactivación insercional del gen <i>bp1092</i> de <i>B. pertussis</i>	Este trabajo
pK18mob-sacB-SR1492	Inactivación insercional del gen <i>bp1092</i> de <i>B. pertussis</i>	Este trabajo
pMQ72	Clonado de genes para sobreexpresión	²⁵⁵
pMQ72-gcbC	Sobreexpresión del gen <i>gcbC</i>	¹⁷³
pMQ72-bp1492	Sobreexpresión del gen <i>bp1492</i>	Este trabajo
pMQ30	Base para vectores para delección de genes por doble recombinación	²⁵⁵
pMQ30-mutSer2109	Mutación sustitutiva SerXAla – BB2109	Este trabajo
pMQ30-mutHis2109	Mutación sustitutiva HisXAla – BB2109	Este trabajo
pBBR1-MCS5-nptII	Sobreexpresión de genes en <i>Bordetella</i>	²⁵⁰
pBBR1-MCS5nptII-bp1492	Sobreexpresión de <i>bp1492</i> en <i>Bordetella</i>	Este trabajo
pBBR1-MCS5nptII-z-1492	Sobreexpresión de la variante Z-1492 en <i>Bordetella</i>	Este trabajo
pBBR1-MCS5nptII-bb4664	Sobreexpresión de <i>bb4664</i> en <i>Bordetella</i>	Este trabajo

ANEXO III: Primers utilizados

Nombre	Uso	Secuencia
BP1492F-Eco	Expresión de BP1492	TACCCGTTTTTTTTGGGCTAGC GAATTCGAGTTTGTGCATGTGT CTCGGAATGGCC
BP1492R-Hind	Expresión de BP1492	CCAAGCTTGCATGCCTGCAG GTCGACTCTAGAGGATCACA CCTAGCCGGGATAGCACAGG
GGDEF BP1492 Fdw	Construcción de variante Zip-GGDEF	GTGGGTGAACGTGGGGTACC CATCTATCCCGCACGGATCC TCTGACCC
GGDEF BP1492 Rev	Construcción de variante Zip-GGDEF	CCAAGCTTGCATGCCTGCAG GTCTTAATGATGATGATGATG ATGCTAGCCGGGA
LZipper domain pKT25 Fdw	Construcción de variante Zip-GGDEF	CCGTTTTTTTTGGGCTAGCGAA TTCAGGAGGACAGCTATGGG TACCTATCCAGCG
LZipper domain pKT25 Rev	Construcción de variante Zip-GGDEF	GGTACCCACGTTACCCAC CAGTTTTTTCAGGCGCG
MutSR BP1492 Fwd	Obtención de mutante insercional en <i>bp1492</i>	GGCCGCGATTGTTATGGAAC
MutSR BP1492 Rev	Obtención de mutante insercional en <i>bp1492</i>	TCGCTCTCCCGGAAAACTC
MutSR BP1092 Fdw	Obtención de mutante insercional en <i>bp1092</i>	CGCGCCGACGGCTCGCTGCA
MutSR BP1092 Rev	Obtención de mutante insercional en <i>bp1092</i>	TGCGACTGGACCAGGGCCGT
M13-Fw 40	Chequeos plásmidos pBB5 y pK18mob	GTTTTCCAGTCACGACG
M13-Rv	Chequeos plásmidos pBB5 y pK18mob	AGCGGATAACAATTCACACA GGA
Q30VerifyF	Chequeos plásmido pMQ30	GAGTCAGTGAGCGAGGAAG
Q30VerifyR	Chequeos plásmido pMQ30	CAGACCGCTTCTGCGTTCTG
Km1 (IDT)	Chequeos plásmido pk18mob	CAGTCATAGCCGAATAGCCT
BB4664_Fw	Expresión de BB4664	CCCGTTTTTTTTGGGCTAGCGA ATTCGGGGGCTGGAGCGCAA GCGC
BB4664_RV	Expresión de BB4664	GCCAAAACAGCCAAGCTTTC AGTGGTGATGGTGATGATGG GCGGCCAGCGCGGTGCGC
F1/mutHis2109-Fw	Clonado de fragmento F1 para mutante HisXAla <i>bb2109</i>	GACCGCTTCTGCGTTCTGAT CCGGCAACCAACAGCTGG
F1/mutHis2109-Rv	Clonado de fragmento F1 para mutante HisXAla <i>bb2109</i>	GTACGCAGTTCGGCCGACAG CAGCG
F2/mutHis2109-Fw	Clonado de fragmento F2 para mutante HisXAla <i>bb2109</i>	CGCTGCTGTGCGCCGAACTG CGTAC
F2/mutHis2109-Rv	Clonado de fragmento F2 para mutante HisXAla <i>bb2109</i>	AATTTACACAGGAAACagcA CATCGATATGCACCGGTTG
F1/mutSer2109-Fw	Clonado de fragmento F1 para mutante SerXAla <i>bb2109</i>	GACCGCTTCTGCGTTCTGATA CCAGGTGCTCAGTCCCGAG
F1/mutSer2109-Rv	Clonado de fragmento F1 para mutante SerXAla <i>bb2109</i>	AGCCCTAGTCCGGCGCCGG GCGTTT
F2/mutSer2109-Fw	Clonado de fragmento F2 para mutante SerXAla <i>bb2109</i>	AAACGCCCGGCGCCGGACTA GGGCT

F2/mutSer2109-Rv	Clonado de fragmento F2 para mutante SerXAla <i>bb2109</i>	AATTTCACACAGGAAACAGCC CCGATGGCGTGTGCTGCA
------------------	--	---

ANEXO IV: Proteínas identificadas

**Proteínas identificadas en la proteómica BPSM vs 1092-
(condición pV)**

T: Protein IDs	C: Student's T-test Significant W_Δ	C: Student's T-test significant	N: -Log Student's Ttest p-value W_Δ	N: Student's T-test Difference W_Δ
Q7VUX9	+	W_Δ	5,38395	3,74254
Q7VU58	+	W_Δ	2,85691	0,250114
Q7VXC3	+	W_Δ	2,51085	-0,527478
P0A3X2	+	W_Δ	2,18179	0,506565
Q7VY74	+	W_Δ	2,17028	0,555918
Q7VYX6	+	W_Δ	2,12634	0,627942
Q7VSH4	+	W_Δ	2,09714	-1,58322
Q7VU19	+	W_Δ	2,09239	0,327947
Q7VW96	+	W_Δ	2,07532	-0,517727
Q7VUR3	+	W_Δ	2,04482	0,411281
Q7VZN2	+	W_Δ	2,04196	0,34124
Q7VSL8	+	W_Δ	1,99697	-2,53477
Q7VUJ7	+	W_Δ	1,95049	0,627997
Q7VTD9	+	W_Δ	1,91609	0,385466
Q7VV99	+	W_Δ	1,90727	0,404428
Q7VT26	+	W_Δ	1,8523	1,8141
Q7VT77	+	W_Δ	1,83501	0,250589
Q7VXK8	+	W_Δ	1,82806	1,91794
Q7W0G1	+	W_Δ	1,82694	0,195647
Q7VXG5	+	W_Δ	1,75655	2,37519

T: Protein IDs	C: Student's Ttest Significant W_Δ	C: Student's T-test significant	N: -Log Student's Ttest p-value W_Δ	N: Student's T-test Difference W_Δ
P04977			0,277441	0,401694
Q7VWJ2			0,277084	0,185071
Q7VW40			0,276293	0,295078
Q7VUK6			0,276111	-0,121749
Q7VSE2			0,275973	0,130039
Q7VUX0			0,274119	0,249463
Q7VZ87			0,272773	0,196364
Q7W082			0,27225	0,586218
Q7VZM5			0,271398	0,371763
Q7VRZ5			0,271149	0,377445
Q7VY05			0,269883	0,129236
Q7VTZ8			0,269028	-0,140933
Q7VXP5			0,268049	-0,213544
Q7VV91			0,267559	-0,0706491
Q7VZF3			0,266915	-0,0745707
Q7VZ27			0,266376	-0,210713
Q7W0J8			0,26575	0,103483
Q7VXA1			0,265722	-0,112251
Q7VXH1			0,265536	0,0909595
Q7VSN5			0,26503	0,21792

Q7VW06	+	W_Δ	1,7471	0,438532
Q7VZG1	+	W_Δ	1,72291	0,763078
Q7VY64	+	W_Δ	1,71763	-0,343647
Q7VSY3	+	W_Δ	1,70616	0,652719
Q7VXM8	+	W_Δ	1,68502	0,756589
Q7VZ16	+	W_Δ	1,68387	-0,271205
Q7VVU0	+	W_Δ	1,66139	1,85287
Q7VSQ6	+	W_Δ	1,65474	0,498087
Q7VS88	+	W_Δ	1,63835	0,221617
Q7VU70	+	W_Δ	1,62471	0,285124
Q7VYN2	+	W_Δ	1,62122	-0,534182
Q7VT64	+	W_Δ	1,6159	0,232
Q7VWC1	+	W_Δ	1,60831	0,652521
Q7VVH7	+	W_Δ	1,57197	0,906457
Q7W032	+	W_Δ	1,56628	0,465297
Q7VZY6	+	W_Δ	1,54183	0,719804
Q7VVA3	+	W_Δ	1,53559	0,97655
Q7U358	+	W_Δ	1,53357	-0,27373
Q7VWV1	+	W_Δ	1,52966	-0,621123
P0DKX8	+	W_Δ	1,51564	0,23081
Q7VY34	+	W_Δ	1,50927	0,179703
Q7VU32	+	W_Δ	1,49621	0,468256
Q7VSU5	+	W_Δ	1,4954	0,34992
Q7VTI6	+	W_Δ	1,48105	0,287069
Q7W0L3	+	W_Δ	1,47602	0,345956
Q7VV73	+	W_Δ	1,47548	-0,196323

Q79GT7				0,264766	0,108153
Q7VY44				0,264719	0,106638
Q7VV53				0,261616	0,303825
Q7VXX6				0,260793	-0,121613
Q7VW88				0,260346	-0,273453
Q7VY09				0,260141	0,100517
Q7VWE5				0,259924	0,0459228
Q7VZ55				0,258015	0,112342
Q7W0N0				0,257962	0,399971
Q7VYN1				0,257705	0,0760508
Q7VXD0				0,257461	-0,126934
Q7VX98				0,256889	0,129788
Q7VUW5				0,256817	-0,0721445
Q7VZ63				0,256615	0,186364
Q7VS83				0,256503	0,109113
Q7VWS6				0,254703	0,0865598
Q7VWW0				0,253344	0,0865221
Q7VY90				0,253341	0,167763
Q7VXL5				0,253082	-0,238041
Q7VYD4				0,2517	0,273814
Q7VZ70				0,251456	-0,112053
Q7VY68				0,250472	0,136594
Q7VSD3				0,249712	0,267506
Q7VYL3				0,2478	-1,10773
P66846				0,246917	0,056603
Q7VZ22				0,245951	-0,154109

Q7VS87	+	W_Δ	1,47402	-0,446088
Q7VU05	+	W_Δ	1,43984	0,554101
Q7W0D1	+	W_Δ	1,40561	0,207455
Q7VUN8	+	W_Δ	1,40102	1,88995
Q7VTN3	+	W_Δ	1,40091	0,202416
Q7VZN1	+	W_Δ	1,3926	0,158327
Q7VWI6	+	W_Δ	1,38337	0,506851
Q7VYA2	+	W_Δ	1,37489	-0,798459
Q7VUK0	+	W_Δ	1,35946	0,271684
Q7VV96	+	W_Δ	1,35935	-0,160767
Q7VZG8	+	W_Δ	1,3519	0,601
Q7W083	+	W_Δ	1,35138	0,222361
Q7W0Q1	+	W_Δ	1,33289	0,370757
Q7VZD4	+	W_Δ	1,33238	0,773737

Q7VSG5			0,245651	-0,243322
Q7VV46			0,245278	-0,0917697
Q7VZ57			0,244964	0,167837
Q7VZS4			0,244881	0,388384
Q7VXI8			0,244751	-0,0939236
Q7VS28			0,244627	-0,119193
Q7VTJ7			0,243593	0,0782003
Q7VSW7			0,243583	0,160469
P12255			0,242511	-0,208469
Q7VS70			0,24234	-0,267404
P0A4H2			0,241933	0,174301
Q7VU66			0,241642	-0,131986
Q7W0F7			0,241462	0,141787
Q7VYZ8			0,240716	-0,238755

Q7VUW2	+	W_Δ	1,32564	0,250642
Q7VYM6	+	W_Δ	1,30857	0,282486
Q7VUJ3	+	W_Δ	1,30249	0,291539
Q7VYC0			1,29904	-0,291377
Q7VXZ7			1,29746	0,251757
Q7VUE5			1,281	0,89751
Q7VY71			1,28005	-0,244965
Q7VXG6			1,27991	0,249739
Q7VX09			1,27819	0,312159
Q7W0Q6			1,26705	0,151585
Q7VVJ8			1,26045	0,420842
Q7VU55			1,25923	0,300339

Q7VSA4			0,238114	0,254224
Q7VST0			0,238076	0,126517
Q7VZC8			0,237817	0,0689187
P81549			0,236068	0,194224
Q7VY98			0,236063	-0,100031
Q7VYU6			0,23556	0,109545
Q7VSU4			0,23477	-0,171394
Q7VYI0			0,234167	-0,203496
Q7VTF6			0,232957	-0,108909
Q7VV33			0,232955	0,24888
Q7VWW5			0,232602	0,117088
Q7VT03			0,231871	-0,050014

Q7VSL9			1,25844	0,287907
Q7W048			1,24842	2,11551
Q7VYQ6			1,23206	-0,22256
Q7VUG5			1,19204	-0,24154
Q7VUP2			1,19096	0,380674
Q7VYA5			1,17793	-0,522974
Q7VVS6			1,17584	-0,201908
Q7VTH2			1,16215	-0,113399
Q7VUQ9			1,15718	-0,17856
Q7VTE4			1,15479	0,327457
Q7VYS3			1,146	0,275583
Q7W0G5			1,11959	0,352823
Q7VT61			1,11351	-0,476373
Q7VUX8			1,09872	0,508872
Q7VVR1			1,06768	0,390038
Q7VZE8			1,06166	-0,218509
Q7VSY5			1,05982	0,978498
Q7VTG8			1,058	0,277307
Q7VZG5			1,05062	-0,169888
Q7VWP7			1,05059	0,467012
Q7VRZ6			1,04567	-0,230682
Q7VSZ7			1,04358	0,299219
Q7VZQ0			1,04339	-0,13352
Q7VUG8			1,03444	0,26614
Q7VZS5			1,03277	-0,2084
Q7VXP6			1,03108	-0,364913

Q7VU46			0,231795	-0,10126
Q7VYV4			0,23071	-0,0835471
Q7VRY0			0,229419	-0,0870605
Q7VXW9			0,229353	0,104691
Q7VWC4			0,22868	0,0673862
Q7VUQ1			0,228668	0,238065
Q7VTN0			0,228498	0,194593
Q7VWM5			0,227043	-0,294959
Q7VS22			0,22487	-0,672927
Q7VUE7			0,223643	0,285414
Q7VS89			0,223634	0,0494452
Q7VZ67			0,22344	0,117311
Q7VYH7			0,223237	0,491524
Q7VZ89			0,222885	0,362164
Q7VZU1			0,222179	-0,0967007
Q7W0S4			0,221294	0,083818
Q04064			0,220971	0,0529118
Q7VSB7			0,219881	-0,299818
Q7VU13			0,219605	0,367834
Q7VT91			0,217169	0,251239
Q7W0S0			0,216828	-0,110465
Q7VUU5			0,216073	-0,0737519
Q7VZC0			0,214412	-0,0561833
Q7VZG3			0,213051	-0,0611243
Q7VVM3			0,212935	-0,12378
Q7VSY8			0,212839	-0,10462

Q7W0E5			1,02497	-0,273905
Q7VX44			1,02382	-0,462135
Q7VU41			1,02202	-0,281191
Q7VUN9			1,01825	-0,347265
Q7VW25			1,00898	0,280899
Q7VST5			1,00327	0,900673
Q7VXN4			0,999374	0,331195
Q7VYV6			0,998571	-0,364582
Q79GQ5			0,993399	1,28524
Q7W0E3			0,991371	-0,263806
Q7W0A0			0,991308	0,234996
Q7VSM1			0,966784	0,403891
Q7VSP0			0,963785	0,328175
Q7VU91			0,95821	0,35521
Q7VU03			0,956175	0,165868
Q7VX91			0,9546	-0,212597
Q7VXD9			0,951908	0,281401
Q7VU01			0,948405	1,46104
Q7VXY3			0,946801	-0,3517
Q7W0K2			0,939557	0,763242
Q79GM4			0,934071	0,324071
Q7VVK5			0,920641	0,805115
Q7VWM0			0,90642	-0,0927811
Q7VZ37			0,905259	-0,264222
Q7VVM6			0,90513	-0,526791
P33409			0,903949	0,301902

Q7VSS1			0,212242	0,0503755
Q7VYY7			0,212051	0,184538
Q7VV03			0,210508	0,117149
Q7VV05			0,209869	-0,0966182
Q7VTC8			0,209263	-0,0635777
Q7VXH2			0,208848	-0,223357
Q7VXL9			0,208683	-0,108863
Q7VTA2			0,208384	-0,0934477
P04978			0,207495	0,311009
Q7VU75			0,207459	0,0987105
Q7VTM5			0,205879	-0,209282
Q7VUP3			0,204961	0,0928226
Q7VUF4			0,204778	-0,055222
Q7VX60			0,203562	-0,0570698
Q7VT05			0,202163	-0,0749636
Q7VZ76			0,201894	0,684469
Q7VW37			0,201742	0,031229
Q7VYS5			0,201615	0,111464
Q7U365			0,20106	0,165354
Q7VYK5			0,201026	-0,127864
Q7VSN3			0,200748	-0,118643
Q7VT92			0,200729	-0,355789
Q7W069			0,199744	0,0427032
Q7VZJ2			0,198813	-0,143922
Q7VSX6			0,198674	-0,218689
Q7VVF5			0,197107	0,180244

Q7VS81			0,902308	0,496291
Q7VYC4			0,90163	-0,448733
Q7VWU8			0,900341	-0,402149
Q7VVA0			0,895452	0,180124
Q7VW20			0,894535	0,274716
Q7VWM2			0,892006	0,335748
Q7VW03			0,891833	0,850722
Q7VW51			0,890165	0,298057
Q7VZ58			0,886826	-0,544848
Q7VTK4			0,886809	-0,257798
Q7VTE6			0,886334	0,547005
Q79H42			0,885853	0,249095
Q7VSZ8			0,871682	0,480292
Q7VYP5			0,869446	-0,196474
Q7VVY1			0,865723	0,729735
Q7VY72			0,86532	-0,361062
Q7VZE9			0,859592	0,233725
Q7VWG5			0,853598	-0,345226
Q7VY27			0,851325	0,155789
Q7VTT5			0,843213	0,153302
Q7VWI3			0,840689	0,615579
Q7VZC7			0,837411	0,261831
Q7VX03			0,833236	-1,29423
Q7VYM2			0,832628	0,317297
Q7VUE3			0,831906	0,214953
Q7VWA8			0,830298	0,364308

Q7VW31			0,195483	-0,224472
Q7VZM9			0,19538	-0,04352
Q7VZX2			0,194877	0,143625
Q7VTD3			0,194845	0,0869317
Q7VSU1			0,194576	0,0628204
Q7VV15			0,194324	0,149898
Q7VTS2			0,193694	-0,478015
Q7VZG0			0,193192	-0,0456328
Q7VW27			0,192225	0,22937
Q7VWM6			0,190078	0,17321
Q7W0K3			0,189834	0,163855
Q7VWG3			0,189084	-0,522601
Q7VW48			0,188835	-0,0880561
Q7VSN2			0,18854	-0,0749793
Q7VTD0			0,188329	0,104613
Q7VXM4			0,187784	0,207453
Q7VRZ2			0,186418	-0,103792
Q7VU18			0,186125	0,195156
Q7VXA7			0,186078	-0,0666099
Q7VWX9			0,185887	0,0873284
Q7VW68			0,185374	0,0619125
Q7VS27			0,184035	0,243904
Q7VW58			0,184015	0,147609
Q7VWD8			0,183861	0,115994
Q7W0K0			0,182899	0,118228
Q7VXR3			0,18099	0,317562

Q7VY75			0,826162	0,349834
Q7VWA1			0,823986	-0,0999565
Q7VZT6			0,822932	0,197442
Q7VYB8			0,819626	0,241621
Q7VWE9			0,81707	0,471176
Q7VWF6			0,816267	-0,18299
Q7VTJ6			0,815878	0,394145
Q7VYC9			0,815465	-0,132554
Q7VSE9			0,801628	0,237755
Q7VVB6			0,801451	-1,70869
Q7W0Q0			0,798468	0,246102
P0A320			0,796821	0,385969
Q7VW74			0,792534	-0,61763
Q7W010			0,789583	0,176316
Q7VVI5			0,784972	-0,221168
Q7VY16			0,783406	1,21542
Q7VV21			0,783176	0,459461
Q7VVF4			0,779182	0,174539
Q7VW47			0,776424	0,475891
Q7VTF1			0,770444	-0,295658
Q7VZP7			0,768883	-0,349247
Q7VTD7			0,764391	0,200603
Q7VUE2			0,755357	0,880647
Q7VV20			0,754906	0,169693
Q7VY76			0,753312	0,151569
Q7VW29			0,752798	-0,272934

Q7VU09			0,18004	0,0711975
Q7VZ18			0,179785	0,0210605
Q7VTA8			0,17891	0,0602746
P17835			0,178811	-0,070755
Q7W0B0			0,178518	0,369303
Q7VUJ8			0,178419	0,442857
Q45338			0,176981	-0,233219
P0A323			0,176723	-0,0775623
Q7VTP4			0,176648	0,0389318
Q7VW70			0,176376	0,146889
Q7VXY4			0,176353	-0,04774
Q7W0E4			0,176286	-0,243288
Q7VWF3			0,175168	-0,128797
Q7VU69			0,175166	0,0769205
Q7VZU8			0,173027	-0,240097
Q7W018			0,171808	-0,15124
Q7VUK2			0,171587	0,123911
Q7VUP9			0,171481	-0,173207
Q7VYL4			0,169021	-0,0897336
Q7VU65			0,168542	-0,0565434
Q7VU72			0,167124	0,0808802
Q7VX12			0,163389	-0,138478
Q7VXC7			0,163165	0,137073
Q7VTD5			0,16294	0,107764
Q7VZU5			0,162471	0,116104
Q7VU00			0,16194	-0,26618

Q7VU12			0,751354	0,182278
Q7VTF2			0,746523	0,408998
Q7VTG5			0,741602	0,303236
Q7VTS0			0,741582	0,590454
Q7VWB6			0,740865	0,279943
Q7VS74			0,740556	-0,207985
Q7VUN0			0,73051	1,13427
Q7VZU0			0,730058	-0,264303
Q7VUG1			0,727981	-0,235202
Q7VSH0			0,727406	0,310432
Q7VYD7			0,727252	0,431395
Q7W098			0,725815	0,309616

Q7VWW2			0,161822	0,136954
Q7VZX6			0,160726	0,0635004
Q7VUV9			0,16036	0,0609436
Q7VXP2			0,160109	0,25805
Q7VT06			0,15995	-0,0897903
Q7U359			0,159102	-0,0287771
Q7VZ61			0,159019	-0,163399
Q7VV88			0,158438	0,0851288
Q7VTC7			0,158354	0,0835667
P0A3R5			0,15832	0,275009
Q7W061			0,158316	0,0260158
Q7VS24			0,157747	-0,206367

Q7VT93			0,721688	0,27203
Q7VT31			0,721313	-0,94568
Q7VTA0			0,720756	-0,239973
Q7VTI5			0,716218	0,157062
Q7VUD9			0,714582	0,374068
Q7W0H0			0,712736	0,352621
Q7VT97			0,712383	0,127259
Q7VTF9			0,70927	0,294382
Q7VWQ4			0,707121	0,473806
Q7VWK7			0,706959	0,171914
Q7VY36			0,703491	0,297659
Q7VVY4			0,702874	-0,100119
Q7VVC6			0,701304	-0,222389
Q7VVF6			0,701149	0,40063

Q7VXD4			0,157459	-0,127838
Q7VVA1			0,155881	-0,0260339
Q7VZP2			0,155875	-0,300201
Q7W0Q5			0,155102	0,0625353
Q7VXP8			0,153179	-0,0493865
Q7VYB4			0,153177	-0,197049
Q7VZ25			0,152801	0,070333
Q7VYB3			0,152732	0,0370617
Q7VXH5			0,152244	-0,0780935
Q7VVZ2			0,151996	-0,0995793
Q7VW53			0,151871	0,295723
Q7W0K5			0,151856	0,10127
Q7VU47			0,150419	0,0978608
P48210			0,1502	-0,131688

Q7VX16			0,699976	0,139024
Q7VTC0			0,698897	0,226997
Q7VUR4			0,69783	0,512853
Q7VTF5			0,695944	-0,461371
Q7VWK1			0,695582	0,137607
Q7W0K7			0,694942	0,301487
Q7VWL5			0,69118	-0,108253
P37369			0,689826	0,202207
Q7VWB2			0,686707	0,192876
Q79H37			0,686404	0,59735
Q7VV43			0,676006	-0,218905
Q7VSZ6			0,674509	0,429041
Q7W0A9			0,673766	0,308898
Q79GQ0			0,673654	0,516916
Q7VTS5			0,671377	0,480942
Q7VT29			0,671309	-0,291668
Q7VTU1			0,670914	0,220366
Q7VVA6			0,670137	-0,591547
Q7VXJ5			0,66634	-0,145521
Q7VY97			0,663126	-0,19152
Q79GG1			0,662837	0,5402
Q7VTR4			0,661014	0,633615
Q7VWX6			0,660909	0,204542
Q7VVC0			0,658106	-0,12953
Q7VVT4			0,657574	0,347736
Q7VUI3			0,657367	0,331229

Q7VXG7			0,149277	0,152101
Q7VWC8			0,148322	-0,110615
Q7VTC9			0,148217	-0,0545068
Q7VZ03			0,148143	0,12427
Q7VXM9			0,146866	-0,111387
Q7VSW3			0,146539	0,0614142
Q7VSW2			0,146308	0,0881314
Q7VYB0			0,145901	0,059279
Q7VW77			0,14581	-0,0610566
Q79GE1			0,145155	-0,177556
Q7W050			0,144821	0,0337505
Q7VZP4			0,14469	-0,0695896
Q7W0I9			0,144669	-0,0509663
Q7VUU1			0,144341	0,21042
Q7VUH5			0,14412	-0,148288
Q7VSR1			0,144117	0,175546
Q7VY01			0,143473	-0,159989
Q7VSN0			0,143291	-0,172743
Q7VVF9			0,142845	0,100124
Q7VTB9			0,142693	0,0608206
Q7VXF6			0,141942	-0,0588083
Q7VWL3			0,141714	-0,0450559
Q7VWY4			0,141482	-0,135536
Q7VWL1			0,141354	-0,145297
Q7VZ72			0,14132	-0,124689
Q7VVU9			0,14023	-0,0613871

Q7VZV3			0,65716	0,116841
Q7VXD5			0,656299	0,182926
Q7VZQ2			0,653649	-0,162292
Q7VVE5			0,653169	0,568396
Q7VUH2			0,65151	0,236061
Q7VXG8			0,648946	0,551246
Q7VXN0			0,647805	-0,158562
Q7VSH2			0,643061	0,318006
Q7VYR6			0,639344	0,0953851
Q7VZX4			0,638837	0,390434
Q7VSG4			0,632421	0,262587
Q7VX14			0,628435	-0,214581
Q7VU67			0,627821	0,0995774
Q7VZ53			0,624497	-0,548753
Q7VZF6			0,62239	0,513391
Q7VV74			0,621165	0,266895
Q7VYC7			0,620782	0,31819
Q7VV70			0,620365	0,309542
Q7VUZ1			0,618996	0,360298
Q7VUN4			0,616039	1,57721
Q7VV19			0,614615	0,178892
Q7VWH3			0,61086	0,912806
Q7VW71			0,609445	0,259994
Q7VTK9			0,609007	0,659684

Q7VXZ9			0,604775	-0,144258
Q7VU38			0,603875	1,37759

Q7W0K8			0,139481	0,282909
Q7VXD2			0,139037	0,0995989
Q7VTJ8			0,138988	0,106629
Q7VTC6			0,137991	0,0593739
Q7VWZ0			0,137898	0,103193
Q7VYV9			0,136934	-0,0440712
Q7VTK5			0,136846	-0,0581841
Q7VXZ8			0,136313	-0,10527
Q7VVX6			0,134319	0,180614
Q7VVV4			0,13383	0,0876551
Q7VW65			0,133535	-0,0599632
Q7VYZ9			0,133425	-0,0509901
Q7VS80			0,132567	0,102061
Q7VU48			0,132472	-0,0717373
Q7VSD4			0,132306	-0,461023
Q7VW86			0,131771	-0,0966368
Q7VYC3			0,13172	-0,187951
Q79GR9			0,131574	0,318384
Q7VTI0			0,130233	-0,129646
Q7VWV8			0,129663	0,0293164
Q7VXG9			0,129422	0,0747404
Q7VTU2			0,128958	0,0442061
Q7VWW9			0,12881	-0,268364
Q7VZB3			0,1282	0,0404963

Q7VVI8			0,126413	-0,0834808
Q7VYK8			0,126043	-0,076386

Q7VXX8			0,603019	0,358023
Q7VZA9			0,602639	0,13904
Q7VU81			0,595303	-0,234447
Q7VSI9			0,594465	0,518109
Q7VWJ0			0,594085	0,533076
Q7VT25			0,592338	0,365338
Q7VZL3			0,59212	-0,419777
Q7VVJ6			0,587884	-0,538664
Q7VY26			0,5876	-0,192157
Q7VYQ4			0,586079	0,458535
Q7VTB7			0,584454	0,12853
Q7W0M6			0,583886	0,213406
Q7VSZ2			0,583445	0,110769
Q7VXB3			0,577155	0,153809
Q7VWY1			0,577039	-0,163647
Q7VW30			0,574886	0,333977
Q7VZ50			0,574588	-0,715338
Q7VV08			0,573487	-0,2757
Q79GE3			0,572454	0,228415
Q7VWW8			0,571561	0,103561
Q7VTM6			0,570936	0,217453
Q7VYA4			0,570608	-0,232944
Q7VXZ0			0,566803	-0,160869
Q7VV40			0,565783	0,335835
Q7VY37			0,562251	0,244955
Q7VY51			0,561877	-0,808972

Q7VRZ4			0,126013	-0,0634947
Q7VXW0			0,125024	0,0572143
Q7VV04			0,124805	-0,0882668
Q7VZ75			0,124308	0,194857
Q7VTR7			0,12282	0,106165
Q7VY92			0,122491	-0,0320964
Q7W0M1			0,122437	0,0666156
Q7VZZ5			0,12241	-0,109152
Q7VSP8			0,122071	-0,0423074
Q7VWJ7			0,121985	-0,284198
Q7VUS8			0,121149	0,0776863
Q7VZN4			0,120414	-0,0643501
Q7VT71			0,119896	-0,0524411
Q7W001			0,119025	-0,0516458
Q7VUP6			0,118115	-0,136741
Q7W062			0,116489	-0,148368
Q7U361			0,116206	-0,0565419
Q7VZC5			0,116039	0,0537281
Q7VYC2			0,115825	0,0957065
Q7VYT6			0,115618	-0,0667658
Q7W0N9			0,115034	0,0510926
Q7VXX1			0,114953	-0,129998
Q7VVH3			0,114812	0,118727
Q7VTN8			0,113962	0,0689859
Q7VTQ8			0,113024	-0,0594187
Q7VSP3			0,112887	0,256706

Q7VYH5			0,559885	0,661293
Q7VV16			0,558309	0,792079
Q79GP9			0,557764	0,817776
Q7VVG5			0,557618	0,230791
Q7VZH1			0,556482	0,248808
Q7VTF8			0,555413	0,2442
Q7VUT9			0,555219	0,298561
Q7VYL2			0,550444	0,243631
Q7W0S3			0,550114	0,18762
Q7VUF7			0,550022	0,302484
Q7VS44			0,547657	0,855063
P05788			0,545561	0,153326
Q7VZ79			0,54414	0,117592
Q7VXF5			0,543219	-0,288374
Q7VTB4			0,542256	0,203088
Q7VSN6			0,540092	-0,065804
Q7VVB1			0,539662	0,107444
Q7VTA6			0,538098	0,154836
Q7VYP7			0,536361	-0,110078
Q7VZV1			0,535762	-0,153248
Q7VW64			0,535386	-0,281152
Q79H46			0,534485	0,199875
Q7VY31			0,533749	0,261764
Q7VUZ9			0,53301	0,340137
Q7VVC9			0,532755	0,205983
Q7VY56			0,532041	0,331233

Q7VV50			0,112744	0,310246
Q79GE2			0,112351	-0,0776234
Q7VZM8			0,111857	-0,0517707
Q7VS41			0,111645	0,118288
Q79H45			0,111071	-0,110487
Q7W0G3			0,110894	0,255874
Q7VXF7			0,110771	0,0415697
Q7VTM4			0,110511	-0,0505857
Q7VZF0			0,11013	0,0486765
Q7VWT3			0,109426	-0,044991
Q7VW07			0,10862	0,0953341
Q7VTV5			0,108222	0,0472527
Q7VWZ2			0,108197	-0,0625429
Q7VW39			0,107793	-0,0530782
Q45388			0,104062	-0,15315
Q7VVL0			0,103358	-0,125639
Q7VVV3			0,102911	0,0690494
Q7VVC4			0,102857	-0,243925
Q7W0I8			0,102269	0,0657415
Q7VVV2			0,101684	0,101707
Q7VUV7			0,10162	-0,0499916
Q7VZ59			0,101594	0,122963
Q7VW21			0,101189	0,074729
Q7VVG2			0,101059	0,0562868
Q7VTC1			0,100425	0,049509
Q7VSH3			0,100221	0,0622768

Q7VSK7			0,531907	-0,403975
Q7VYR1			0,531733	0,130823
Q7VZT4			0,530648	-1,05704
Q7VV79			0,530192	0,249882
Q7VY03			0,528144	0,339355
Q7VW28			0,527408	0,20982
Q79H47			0,526471	0,19008
Q7VS40			0,522385	0,175963
Q7W007			0,521784	-0,219282
Q7VTE5			0,51997	0,241353

Q7VT57			0,0999999	0,153137
Q7VSV1			0,0999943	0,0418601
Q79GE7			0,0998234	-0,0728741
Q7VTD4			0,0993959	-0,0432358
Q7VUG6			0,0990936	-0,117522
Q7VUL1			0,0990227	0,124378
Q7VWE8			0,0989076	-0,0328388
Q7VVM4			0,0987135	0,0563993
Q7VTB5			0,0985903	-0,0565772
Q7VYR3			0,0978863	-0,0584269

Q7VW97			0,518806	-0,186525
Q7VY42			0,518266	-0,242187
Q7VUY2			0,518049	-0,764038
Q7VT10			0,516999	0,181539
Q7VU31			0,515803	-0,410979
Q7VYS1			0,511563	-0,369664
Q7W0A4			0,511175	-0,3255
Q7VT00			0,508825	0,704875
Q7VVI7			0,508116	-0,621926
Q7VT65			0,505577	0,590784
Q7VV89			0,502459	0,168941
Q7VUS1			0,501865	0,161949
Q7VVG0			0,501054	0,097147
Q7VY28			0,499928	-0,240829
Q7W080			0,498686	-0,185358
Q7W023			0,498662	0,0996494

Q7VYW4			0,0971725	-0,083034
Q7VUQ7			0,0971243	-0,135581
Q7VZE0			0,0970784	0,0559936
Q7VXI6			0,0963818	-0,126584
Q7VWH1			0,0963528	0,0685248
P40415			0,09621	0,0504074
Q7VZ01			0,0956777	0,0438666
Q7VZD8			0,0955846	-0,0744195
Q7VZB9			0,0955296	0,0644269
Q7W0C9			0,094577	0,0769439
Q7VVU5			0,0941456	-0,051425
Q7VTA5			0,0926858	0,270505
Q7VUF5			0,0920343	0,0818262
Q7VTC5			0,0916853	-0,189594
Q7VTD1			0,0914327	0,0387697
Q79GJ5			0,0913095	0,0937886

Q7VUV8			0,498019	-0,197287
Q7VWL0			0,497948	0,205862
Q7VUL2			0,497831	0,136695
Q7VXB6			0,495665	-0,218462
Q7VU14			0,495269	0,757959
Q7W0G8			0,494371	0,469625
Q7VZY4			0,492825	0,282
Q7VZC3			0,491767	-0,171398
Q7VT90			0,491684	-0,146927
Q79GX8			0,489529	0,212983
Q7VXF8			0,488409	-0,266419
Q7W0C4			0,487249	0,16218
Q7VSQ8			0,486396	0,218852
Q7VWQ1			0,486225	0,330338
Q7W0D7			0,48607	-0,110483
Q7W0L1			0,485872	0,192714
Q7VYB9			0,484257	-0,294416
Q7VWE7			0,481607	0,178863
Q7VUV5			0,480555	0,0903544
Q7VWL6			0,479301	-0,157621
Q7VWL4			0,479296	-0,24266
Q7VYC1			0,475543	0,196939
Q7VSM5			0,47442	0,34662
Q79GR7			0,473997	0,45506
Q7VXC9			0,473452	0,28312
Q7VS65			0,47199	0,128229

Q7VXA0			0,0912788	0,0236087
Q7VV81			0,090492	-0,0885878
Q7VVR2			0,0898252	0,045701
Q7VS21			0,0897072	0,183973
Q7VWL8			0,0896228	0,0719161
Q7VW78			0,0884611	0,0845881
Q7VS00			0,0884224	-0,262432
P0A339			0,0872271	0,0886192
Q7W0A2			0,0872064	-0,0743866
Q7VUU0			0,0867821	0,0676737
Q7VYQ8			0,0861683	-0,103182
Q7VW08			0,0858635	0,046401
Q7VTK3			0,0855807	-0,053761
Q7VYH6			0,0851581	0,143868
Q7VY84			0,0821824	0,103153
Q7W0S6			0,0821201	0,0876756
Q7VUN3			0,0811428	-0,292539
Q7VX94			0,0799502	-0,0691943
Q7VUW7			0,0798061	0,0349221
Q7VWI0			0,0797538	-0,0925512
Q7VVS3			0,0795735	-0,0675235
Q7VSH8			0,0790875	-0,0914273
Q7VX06			0,0788621	-0,0229373
Q7VYR4			0,0785172	0,0317674
Q7VVY8			0,0784472	0,0469275
P0A4U8			0,0769984	-0,0476122

Q7VTA4			0,470731	-0,411491
Q7VZE7			0,470208	0,129007
Q7W0P6			0,470133	0,673692
Q7VUA5			0,469998	0,240589
Q7VUG0			0,469741	0,296477
Q7W008			0,469598	0,292201
Q7VTS6			0,466864	0,91363
Q7VV98			0,466363	0,27177
Q45340			0,464548	0,241774
Q7VYR2			0,464256	-0,269115
Q7VV94			0,464015	0,573609
Q7VVJ1			0,463688	0,28356
Q7VSZ1			0,462101	-0,0671086
Q7W0C0			0,4618	-0,15356
Q7VYM1			0,461489	0,438147
P0A4C5			0,459876	0,223877
Q7VXE0			0,459393	-0,825693
Q7VTK7			0,458993	0,885576
Q7VYN5			0,458212	-0,0936399
Q7VZ84			0,456051	-0,228642
Q7VTB2			0,454853	0,169342
Q7W0J4			0,452908	-0,64555

Q7W0H7			0,451604	0,471768
Q7VVR6			0,450854	0,14165
Q7VZ24			0,446911	0,116233
Q7VV00			0,446813	0,36201

Q7VTN5			0,0767493	0,0768652
Q7VUH9			0,076589	-0,0923657
Q7VX67			0,076271	0,0383
Q7VZC4			0,0761104	0,0341449
Q7VVY2			0,0751653	-0,0556674
Q7VWF8			0,0750554	0,16046
Q7VW67			0,074502	-0,16832
Q7VSI4			0,0744324	0,0395632
Q7VV37			0,0744217	-0,0345359
Q7VTV0			0,0743871	0,0179381
Q7VUQ5			0,074254	0,0266066
Q7VUS9			0,0741599	-0,0705862
Q7VUL5			0,073212	0,0816197
Q7VX96			0,072754	-0,097322
Q7VV72			0,0726213	0,0519633
Q7VYQ9			0,0725659	0,0517173
Q7VUV0			0,0724038	0,0505319
Q7VUW0			0,0722934	-0,0562487
Q7VVD8			0,0722389	0,0545244
Q7VXI7			0,071506	0,046061
P12421			0,0714567	-0,0414701
Q7VS35			0,0712922	-0,0867615

Q7VWC5			0,0712891	-0,121558
Q7VS71			0,0695841	-0,0891781
Q7VWE2			0,0688655	0,124608
Q7W0D6			0,0684996	0,0174074

Q7VVA9			0,4467	0,131325
Q7VVG6			0,445886	-0,20772
Q7VVY0			0,445043	0,248962
Q7VY62			0,444025	-0,142883
Q7VT13			0,440961	0,165009
Q7VU94			0,439462	0,110412
Q7VS82			0,43843	0,229672
Q7VTV4			0,438407	0,211077
Q7VUV6			0,438233	-0,155925
Q7W0C1			0,435713	0,173657
P14283			0,435216	0,0895343
Q7VWS3			0,435068	-0,959579
P0A4E5			0,434295	-0,148801
P0A3E3			0,434066	-0,361494
Q7VSA8			0,433825	-0,137902
Q7VUK1			0,432134	0,179375
Q7VZK2			0,431953	-0,575155
P04979			0,429467	0,534982
Q7VZK8			0,428723	0,36007
Q7W0Q4			0,426205	0,323098
Q7VU20			0,426151	0,113632
Q7W0J9			0,425698	0,233853
Q7VTN4			0,425436	0,399681
Q7VU98			0,425296	0,182878
Q7VU54			0,423855	-0,413998
Q7VUF0			0,422926	0,378304

Q7VU93			0,0681622	-0,0215354
Q7VTT7			0,0679671	0,0171528
Q7VUA3			0,0667987	0,0803828
Q79H48			0,0666858	-0,056931
Q7VZS7			0,0657755	-0,0435934
Q7VTE8			0,0657072	-0,0454354
Q7VZK1			0,0656902	0,147278
Q9X6Y8			0,0655593	-0,0508714
Q7VW87			0,0650946	-0,0303955
Q7VXP1			0,0645999	-0,120935
Q7VSK4			0,0635809	0,0517364
Q7W003			0,063411	-0,0747819
Q7VZ80			0,0633965	-0,108192
Q7VYP8			0,0622696	0,0358353
Q7VWY7			0,0613884	-0,0245366
Q7VZ15			0,0603178	-0,110988
Q7VYS2			0,0601755	-0,0185957
Q7VS46			0,0600328	-0,0461378
Q7VV87			0,0597949	0,0379043
Q7VSE0			0,0595378	0,0512362
Q7VYA3			0,0588697	0,0557885
Q7VRX7			0,0574295	0,0174966
Q7VW32			0,0573502	0,044559
Q7VVE9			0,0567878	0,0818348
Q7VWY2			0,0565551	-0,0609999
Q7VSU7			0,0559497	-0,0203552

Q7VVG8			0,422603	0,201969
Q7VW73			0,422482	-0,0565748
Q79GQ4			0,421969	0,742878
Q7W0D5			0,420396	0,10341
Q7VY60			0,418904	-0,327761
Q7VTM9			0,418475	0,174352
Q7VWJ6			0,416952	0,385127
P0A352			0,415207	-0,16671
Q7VYN8			0,414979	0,106858
Q7VYX5			0,4143	0,371518
Q7VZ56			0,411767	-0,139743
Q7VTF7			0,411561	0,181877
Q7VXK5			0,409095	0,12063
Q7VU45			0,40873	-0,177604
Q7VWA2			0,405868	0,139762
Q79GP4			0,404852	1,30865
Q7VTJ3			0,404645	0,113799
Q7VZG2			0,404089	-0,102078
Q7VU64			0,4038	-0,167976
Q7VXM6			0,402373	-0,235763
Q7VT62			0,401653	0,248097
Q7VUM2			0,400673	-0,195467
Q7VUP5			0,400647	-0,120521
Q7VUQ4			0,400094	0,41716
Q7VU43			0,399869	0,363396
Q7VY02			0,397738	0,65741

Q7VU04			0,0557434	-0,0289607
Q7VVQ9			0,0553563	0,105445
Q7VZU4			0,0553059	-0,0347233
Q7VVR4			0,0552598	0,0357733
Q7VZG6			0,0550352	0,027072
Q7VV17			0,0546217	0,0315351
Q7W0A7			0,0543981	0,0633965
Q7VSE6			0,0538931	0,0699162
Q7VY96			0,0530338	0,0204687
Q7W0M8			0,0520928	-0,0444026
Q7VTH6			0,0520421	-0,0273929
Q7VV41			0,0514442	0,0559111
Q7VY63			0,0511621	0,0196662
Q7VZ35			0,0510371	-0,0348573
Q7W078			0,0508651	-0,0419979
Q7VY14			0,0505149	0,0865636
Q7W0S2			0,0498996	0,0284925
Q7VZQ1			0,0493362	0,0179014
Q7W0F9			0,0488874	0,0159969
Q7VTB3			0,0485544	-0,023756
Q7VVG9			0,0484852	0,0281563
Q7VTU6			0,04832	0,0264435
Q7W041			0,0482954	0,027904
Q7VWK6			0,0482892	0,0816531
Q7VT04			0,0480469	0,017395
Q7VY73			0,0479412	0,0324659

Q7VUH3			0,397437	0,654661
Q7VSF2			0,396352	-0,293629
Q7VY06			0,396336	-0,469673
Q7VUT2			0,392765	-0,160264
Q7VVU3			0,392165	-0,181269
Q7VVE7			0,391997	-0,224424
Q7W0D8			0,391601	0,214934
Q7VV75			0,391535	-0,245814

Q7VY15			0,0478896	-0,106985
Q7VXK3			0,0469462	-0,0312276
Q7VZB8			0,046699	0,0152798
P41399			0,0466253	0,0329952
Q7VTN6			0,0464425	-0,0115294
Q7W0J5			0,0461647	-0,0322204
Q7W0J3			0,0457716	0,035326
Q7VT84			0,0453087	0,0347958

Q7VZF1			0,391068	0,169496
Q7VYR0			0,389704	-0,385546
Q7VU37			0,388548	0,0893106
Q7VSE1			0,388514	-0,147667
Q7VTB6			0,385533	0,161656
Q7VTC2			0,385149	0,263656
Q7VU82			0,383795	-0,166747
Q7VUE4			0,383728	-0,397629
Q7TTK0			0,383612	0,0712547
Q7VWX5			0,383567	-0,197486
Q7VU53			0,383103	0,145189
Q7VYS7			0,383093	0,131399
Q7VZV0			0,382944	0,441955
Q7VVK6			0,382167	0,52316
Q7VS45			0,377765	-0,180463
Q7VVN1			0,373228	0,190755
Q7VXA8			0,372926	0,0932755
Q7VTP7			0,370113	0,986709

Q7VSY6			0,0452225	-0,0115576
Q7VVS5			0,0448279	-0,0139065
Q7VW69			0,0443581	0,072032
Q7VYN6			0,0439303	-0,0225725
Q7VZ05			0,043488	-0,0172806
Q7VY87			0,0432659	-0,0362158
Q7VUJ9			0,0432548	-0,0346994
Q7VV07			0,0431582	-0,0132532
Q7VT07			0,0430879	0,0232673
Q7VWV5			0,0428135	0,0194535
Q7VXM1			0,0427074	0,0276003
Q7VV55			0,042286	0,0406256
Q7VU29			0,0421632	0,108156
Q7VZ83			0,0409967	-0,0289636
Q7VSC7			0,0403538	-0,0379739
Q7W0E8			0,0394787	-0,0191407
Q7VXW5			0,0390752	0,0171742
Q7VS85			0,0383395	0,0106525

Q7VZR1			0,369176	-0,406336
Q7VXA2			0,367031	-0,322932
Q7VU52			0,36582	-0,168499
Q7VUI0			0,36569	0,36857
Q7VT45			0,365352	0,399307
Q7VU59			0,365216	-0,974324
Q7VTS4			0,364101	0,549191
Q7VYP9			0,363927	-0,310893
Q7VSN1			0,363428	-0,173969
Q7VYA8			0,363344	-0,130836
Q7VZD6			0,362189	0,194596
Q7VUQ3			0,361536	-0,298459
Q7VZ86			0,360361	0,179685
Q7VTS8			0,359661	0,824389
Q7VZP9			0,358195	0,159343
Q7VU62			0,357912	0,179507
Q7VWL9			0,357752	0,177782
Q7W006			0,357717	-0,166589
Q7VX48			0,357015	-0,112735
Q08530			0,35667	0,567894
Q7VXK9			0,35553	0,163217
Q7VSM3			0,354135	-0,113662
Q7VVY3			0,354079	-0,240651
Q7TT91			0,353028	0,170794
Q7VYH9			0,352694	-0,17481
Q7VYR5			0,35199	-0,324248

Q7VW38			0,0383014	0,0348644
Q7VYC8			0,0377479	0,0584273
Q7VVH2			0,0373377	0,0220823
Q7VWR4			0,0359177	0,0106068
Q7VUH8			0,0354792	0,0709667
Q7VTG9			0,0350865	0,0110965
Q7VRX6			0,0349424	-0,0139718
Q7VS51			0,0345558	-0,0458536
Q7VW26			0,0345203	-0,0164285
Q79GR2			0,0344701	0,0782404
Q7VV14			0,0344623	0,029397
Q7VUT1			0,0342542	0,0198154
Q7VV92			0,0342398	-0,0191922
Q7VVR7			0,0342339	0,0335007
Q7VTD6			0,0341553	-0,0215268
Q7VZI3			0,0341406	-0,0701303
Q7VSM2			0,0337596	0,0321875
Q7VVA2			0,0331492	-0,0067797
Q7VSQ5			0,0331204	-0,0065823
Q7VXM0			0,0328118	-0,0200768
Q7VU86			0,0323305	-0,0238118
Q7VZ36			0,032011	-0,0284748
Q7VU11			0,0308623	0,0322194
Q7VSG0			0,0305939	-0,0141616
Q7VZ17			0,030246	0,0197759
Q7VX43			0,0300478	-0,027524

Q7VUW9			0,351731	0,135145
Q7VWM1			0,350879	-0,129898
Q79GP1			0,349375	0,158414
Q7VTB1			0,348592	-0,338758
Q7VTR9			0,347531	0,138605
Q7VX85			0,345673	0,485521
Q7VZF5			0,345379	-0,186095
Q7VTM8			0,345315	-0,303248
Q7VZG4			0,345097	0,119326
Q7VX99			0,344156	0,132223
Q7W0B5			0,343404	0,814537
P35077			0,34327	0,153956
Q7VY25			0,343088	-0,061769
Q7VYL8			0,342669	0,158555
Q7VTD2			0,341291	0,18075
Q7VY99			0,33972	-0,146438
Q7VVL1			0,338576	0,082386
Q7W0G6			0,337853	-0,188577
Q7VUA1			0,33633	0,218112
Q7VRY1			0,335598	-0,0907431

Q7W0F5			0,335131	0,955336
Q7VXW8			0,333775	-0,127469
Q79GQ3			0,332873	0,249629
Q7VU44			0,332098	-0,187144
Q7VXD7			0,331862	-0,132375
Q7VTI3			0,33182	0,247854

Q7VU92			0,0299392	-0,0363474
Q7W0H1			0,0293582	0,0578475
Q7VST6			0,0288127	0,0382671
Q7VZQ4			0,0278712	-0,0178084
P33410			0,0276864	-0,018877
Q7VZB0			0,0275149	-0,0184293
Q7VRZ3			0,0271179	-0,0223684
Q7VW76			0,0269684	0,0298171
Q7VZT5			0,0266729	-0,018209
Q7VVF8			0,0264635	0,120142
Q7VVU6			0,026402	-0,0147457
Q7VUQ8			0,0260083	-0,0367675
Q7VU16			0,025535	0,0156908
Q7VS26			0,0255053	0,0151291
Q7VVB8			0,0252544	-0,0110669
Q7VYC6			0,025155	0,0525298
Q7VVV1			0,0248384	0,0232015
P65622			0,0240796	0,0178237
Q9X6Y9			0,0235372	0,0121298
Q7VTW2			0,0232886	0,0321703

Q7VTG4			0,022657	-0,038065
Q7VS43			0,0222995	-0,0109839
Q7VZX9			0,021592	0,0401878
Q7VVI4			0,0211705	0,00955391
Q7VT27			0,0208561	-0,0067248
Q7VXA4			0,0205213	0,010735

Q7W0C3			0,330147	0,106852
Q7VYD0			0,330119	0,0933137
Q7VSR6			0,328137	0,192444
Q7VZU9			0,327799	0,278999
Q7W0S8			0,326987	0,112764
Q7W0R8			0,325681	-0,283099
Q7VTQ0			0,324851	0,214751
Q7VYD1			0,32299	0,14687
Q7VZC9			0,32271	-0,188864
Q7VYZ3			0,321402	-0,115229
Q7W012			0,321143	0,120467
Q7W021			0,320706	0,0766363
Q7VYM0			0,320341	0,211415
Q7VSA2			0,320313	0,152089
Q7VUS7			0,32013	-0,227574
Q7VY32			0,319434	-0,0709391
Q7U364			0,318512	-0,124218
Q7VSY7			0,317879	0,155765
Q7VYT5			0,317224	-1,05633
Q7VZE6			0,315988	0,612421
Q7VW33			0,315609	-0,157476
Q7VUW6			0,315153	0,0639687
Q00879			0,313963	-0,101222
Q7VYV2			0,313933	0,522051
Q7W0M3			0,313789	-0,24883
Q7VVB0			0,313334	-0,0691957

Q7VVC8			0,0198922	0,0181208
Q7VTE3			0,0198549	0,0156794
Q7VZU6			0,0193642	-0,02144
Q7VSY9			0,0171501	0,0121131
Q7W0F2			0,0170913	-0,0250216
Q7VXM2			0,0165732	-0,013813
Q7VTA1			0,0165344	0,0281577
Q7VYV3			0,0158456	-0,0159364
Q7VZZ7			0,0157931	-0,0081263
Q7W0J1			0,0156568	-0,0316515
Q7VUR2			0,0154859	0,0213556
Q7VS25			0,0144361	0,00731134
Q7VZA6			0,0143924	0,00795698
Q7VVC2			0,0143185	-0,022512
Q7VUG2			0,0141481	0,00531101
Q7VXD8			0,0138855	-0,0069614
Q7VYB7			0,0130995	-0,004312
Q7VSD1			0,0129632	-0,0199256
Q7VTC4			0,0127102	0,00562954
Q7VWM3			0,0113746	0,00594759
Q7VXZ4			0,0102813	-0,0097599
Q7VV32			0,0100792	-0,0093927
Q7W0S1			0,009954	-0,0056706
Q7VTF0			0,0094089	0,00386524
Q7VY89			0,0093804	0,0025363
Q7W014			0,0093735	0,00451374

Q7VY22			0,311763	0,2384
Q7VWW1			0,30965	-0,222598
Q7VUM0			0,308193	-0,127261
Q79GN7			0,307856	0,302716
Q7VWC2			0,306924	0,37071
Q7VZY7			0,306103	-0,148413
Q7VXG4			0,305021	-0,166374
Q7VXC5			0,303804	-0,29881
Q7VXH0			0,303733	0,0920086
Q7VXZ3			0,303239	-0,685299
Q7VZT1			0,30266	-0,134718
Q7W081			0,300705	0,175372
Q7VYL5			0,299879	0,362926
Q7VTP8			0,298723	0,423056
Q7W0R9			0,298165	-0,228426
Q7VXK2			0,297988	-0,0698452
Q7VUP1			0,297453	0,196989
Q7W0H2			0,295586	-0,284109
Q7VXY8			0,294234	-0,175899
Q7VVX5			0,294143	0,429118
Q7VU97			0,292646	0,349417
P67690			0,292521	0,658794
Q7VX20			0,289612	0,223929
Q7VTS1			0,288602	0,0662732
Q7VTA7			0,288197	0,140301
Q7VWQ7			0,28725	0,119245

Q7VU27			0,0091781	-0,0028329
Q7VW57			0,0088477	-0,0054941
Q7VXE1			0,0085449	-0,006001
Q7VTQ9			0,0084912	0,00643063
Q7VWF0			0,0082495	0,00850058
Q7VV76			0,0080795	0,00394535
Q7VWA4			0,0076247	0,00250626
Q7W0L2			0,0076032	-0,0089688
P0DKX7			0,0072666	-0,025075
Q7VV97			0,0071529	-0,010006
Q7VUH1			0,0070248	0,0119452
Q7VVR5			0,0068809	0,00527954
Q7VSV3			0,0065369	0,00285053
Q79H25			0,0064469	-0,002872
Q7VSD8			0,0061402	-0,0050445
Q7VW04			0,0060712	0,00156784
Q7VSP7			0,0060248	0,00231457
Q7VSZ3			0,0060196	-0,0125718
Q7VZX5			0,0057631	0,00275517
Q7VYH8			0,0048219	0,00391436
Q7VUL8			0,0043202	0,00124598
P0A448			0,0040746	0,00474501
Q7VW91			0,0039133	0,00592852
Q7VVT8			0,0032934	0,00698996
Q7VSN4			0,0032027	0,00188541
Q7VVR3			0,0025425	0,00132895

Q7VXN6			0,285527	0,0839653
Q7VS29			0,284342	-0,313035
Q7VTU4			0,283318	-0,266465
Q7VZQ3			0,282623	-0,0843439
Q7VWP0			0,280744	-0,131452
Q7VWL2			0,279459	0,122487
Q7VTJ9			0,278964	-0,137341
Q79GQ6			0,277641	-0,67252

Q7VT67			0,0022952	0,00118732
Q7VUE0			0,0022897	-0,0031939
Q7VZJ6			0,0015795	0,00048018
Q7VW79			0,0013788	0,00132704
Q7VY70			0,0013482	0,00403738
Q7VS95			0,0011784	-0,0012054
Q7VWF9			0,0009719	-0,0009456
Q7VWY8			0,0008862	0,00064993
Q7W014			0,0007742	-0,0008583

Proteínas identificadas en la proteómica comparativa BPSM vs 1092- (condición: pBP0338)

T: Protein IDs	C: Student's T-test Significant W_Δ	C: Student's T-test significant	N: -Log Student's Ttest p-value W_Δ	N: Student's Ttest Difference W_Δ
Q7VT05	+	W_Δ	3,72853	0,795361
Q7VUX9	+	W_Δ	3,54196	3,76354
Q7VS26	+	W_Δ	3,41229	0,707652
Q7VVR2	+	W_Δ	3,03068	1,59929
Q7VUT9	+	W_Δ	2,93536	1,09769
Q7VUK6	+	W_Δ	2,92368	1,2762
Q7W0K7	+	W_Δ	2,88072	0,859918
Q7VUS1	+	W_Δ	2,68646	0,743808
Q7VUK3	+	W_Δ	2,64377	0,962931
Q7VS40	+	W_Δ	2,59638	1,14774
Q7VUV0	+	W_Δ	2,57259	0,837043
Q7VSM5	+	W_Δ	2,54484	0,766779
Q7VT31	+	W_Δ	2,54306	-1,26306
Q7VV21	+	W_Δ	2,53033	1,05074
Q7VTE5	+	W_Δ	2,51555	0,818687
Q7W019	+	W_Δ	2,50913	1,65632
Q7VU75	+	W_Δ	2,50172	0,544216
Q7VUJ7	+	W_Δ	2,48765	0,897935
Q7VXM8	+	W_Δ	2,48091	1,38084
Q7VSL7	+	W_Δ	2,45985	1,65979
Q7VT93	+	W_Δ	2,39886	0,736608
Q7VVK6	+	W_Δ	2,3707	1,02

T: Protein IDs	C: Student's Ttest Significant W_Δ	C: Student's T-test significant	N: -Log Student's Ttest p-value W_Δ	N: Student's T-test Difference W_Δ
Q7W0G9			0,481181	0,632577
Q7VUI0			0,480646	0,249251
Q7VZZ4			0,480493	-0,193025
Q7VZG8			0,480477	0,195704
Q7VWM0			0,479951	0,204647
Q7W0J3			0,479669	0,358605
Q7VWT3			0,475878	0,262854
Q7VV85			0,475144	0,83339
Q7VSN2			0,473023	-0,448074
Q7VW78			0,472513	0,839946
Q7VTA0			0,469607	0,859277
Q7VY62			0,469589	0,296904
Q79GE1			0,469584	0,479361
Q7VS89			0,468913	0,299821
Q7VXZ9			0,468517	0,28773
Q7VTS1			0,46816	0,379685
Q7VVR7			0,467846	0,359848
P65852			0,46631	0,371327
Q7VYR1			0,465118	0,260675
Q7VSB7			0,465031	0,250892
Q7VZC5			0,46497	-0,40495
Q7VYP7			0,464769	-0,457361

Q7VT10	+	W_Δ	2,35378	0,742566
Q7VTI5	+	W_Δ	2,30646	0,557155
Q7VV53	+	W_Δ	2,30154	0,647497
Q7VV33	+	W_Δ	2,28647	0,75927
Q7VU69	+	W_Δ	2,26918	0,557206
Q7VY98	+	W_Δ	2,26769	-0,572554
Q7W0J1	+	W_Δ	2,25734	1,13124
Q7W049	+	W_Δ	2,24332	0,866756
Q7VUX8	+	W_Δ	2,23842	0,661284
Q7VUI3	+	W_Δ	2,20683	0,626717
Q7VUN0	+	W_Δ	2,20498	0,68424
Q7VYS0	+	W_Δ	2,20348	1,76928
Q7VUG8	+	W_Δ	2,19525	0,581278
Q7VVU9	+	W_Δ	2,18845	0,339108
P0DKX8	+	W_Δ	2,17029	0,661413
Q7VVF6	+	W_Δ	2,16118	1,05184
Q7VTF9	+	W_Δ	2,15744	0,801727
Q7W0J8	+	W_Δ	2,14833	0,761633
Q7VZX9	+	W_Δ	2,12929	0,808339
Q7VUZ1	+	W_Δ	2,12619	1,30119
Q7VTE2	+	W_Δ	2,07933	2,94118
Q7W0H2	+	W_Δ	2,07841	1,34604
Q7VWN0	+	W_Δ	2,0721	0,768933
Q7W0K5	+	W_Δ	2,06083	0,610567
Q7VTF0	+	W_Δ	2,05061	0,804151
Q7VTL9	+	W_Δ	2,0442	1,97863
Q7VX48	+	W_Δ	2,03849	-0,171296

Q7VWW8			0,464077	0,381202
Q7VVJ1			0,463638	0,203742
Q7VUG5			0,4627	-0,25257
Q79GN3			0,462455	0,65879
Q7VV74			0,460017	1,09231
Q7W0G1			0,459448	0,38785
Q7W0E3			0,458146	-0,273314
Q7W0S1			0,457616	0,339278
Q7VUM2			0,457579	-0,310571
Q7W021			0,457251	0,238639
Q7VTG9			0,455256	0,343164
Q7VW57			0,455152	0,334289
Q7W082			0,454972	0,377584
Q7VWF6			0,452898	-0,391323
Q7VTS3			0,452416	0,954499
Q7VXK9			0,451466	0,291909
Q7VX55			0,45114	-0,229316
Q7VYM0			0,451104	0,35026
Q7VWP7			0,447402	0,307906
Q7VY25			0,446875	-0,548257
Q7VXW8			0,446204	-0,333972
Q7VS45			0,446115	0,285619
Q7VU37			0,442623	0,25527
Q7VXL5			0,441751	1,86994
Q7W0Q6			0,441709	0,149839
Q79GR9			0,440954	0,487562
Q7W0C0			0,440848	0,344508

Q7VU98	+	W_Δ	2,03728	0,803105
Q7VSQ1	+	W_Δ	2,0171	0,853767
Q7VVC7	+	W_Δ	1,99932	1,70455
Q7VXH2	+	W_Δ	1,99154	0,755676
Q7VU13	+	W_Δ	1,97468	0,357748
Q7VTT7	+	W_Δ	1,974	0,6586
Q7W0C1	+	W_Δ	1,97162	0,598292
Q7VUH1	+	W_Δ	1,95843	0,826315
Q7VUR3	+	W_Δ	1,9449	0,626131
Q79GG1	+	W_Δ	1,938	0,963099
Q7VS81	+	W_Δ	1,92245	0,763484
Q7VU32	+	W_Δ	1,91415	0,515093
Q7VWH3	+	W_Δ	1,91339	1,12351

Q7VW04			0,439371	0,207516
Q7VSL8			0,437721	0,413882
Q7VZ87			0,4377	0,184937
Q7VW98			0,437349	0,692473
P0A4U8			0,436786	-0,229688
Q7W006			0,434871	-0,307044
Q7VXB6			0,434835	-0,413558
Q7W0C3			0,432486	0,317052
Q7VSN6			0,430146	-0,284688
Q7VYB0			0,429887	0,285091
Q7VV81			0,429879	-0,617056
Q7VTK9			0,427437	0,559951
Q7VZZ5			0,426251	-0,309282

Q7VU93	+	W_Δ	1,90941	0,447002
Q7VZ01	+	W_Δ	1,8933	0,438632
Q7VY90	+	W_Δ	1,88718	0,768949
Q7VXP2	+	W_Δ	1,88516	1,45246
Q7VV40	+	W_Δ	1,87773	0,771675
Q7VSU5	+	W_Δ	1,87577	0,607158
Q7W0J9	+	W_Δ	1,87306	0,769962
Q7VVL0	+	W_Δ	1,83709	0,937255
Q7VZ67	+	W_Δ	1,82576	0,380585
Q7VYQ4	+	W_Δ	1,82507	0,803805
Q7VVT4	+	W_Δ	1,82437	0,569733
Q7VTN4	+	W_Δ	1,80254	0,319329
Q7W0M6	+	W_Δ	1,80142	0,682261

Q7VXB9			0,42546	0,33792
Q7W0T0			0,424849	0,753464
Q7VTI0			0,424388	0,797021
Q7VU00			0,423309	0,41399
Q7VXR3			0,423197	0,397584
Q7VUU9			0,420698	0,375751
Q7VUQ8			0,420248	0,499545
Q7VS83			0,418676	0,262288
Q7VV89			0,41835	0,239084
Q7VSE1			0,416221	-0,483133
Q7VWG3			0,416001	-0,84606
Q7VZG6			0,41382	-0,338204
Q7VXA8			0,412546	-0,160522

Q7VUR4	+	W_Δ	1,80012	1,25916
Q7VVF9	+	W_Δ	1,79377	0,598683
Q7VTN0	+	W_Δ	1,78927	1,05807
Q7W0Q4	+	W_Δ	1,78189	0,695775
Q7VYT5	+	W_Δ	1,77647	0,610259
Q7W0H7	+	W_Δ	1,77321	0,512242
Q7VSI4	+	W_Δ	1,77305	1,43796
Q7W0K3	+	W_Δ	1,77301	0,400953
P04978	+	W_Δ	1,73763	1,06012
Q7VTG8	+	W_Δ	1,71036	0,693153
Q7VSZ6	+	W_Δ	1,70971	0,958495
Q7VS25	+	W_Δ	1,7078	0,626165
Q7W032	+	W_Δ	1,70759	0,826024
Q79H46	+	W_Δ	1,69209	0,691916
Q7W098	+	W_Δ	1,69066	0,747534
Q7W0B1	+	W_Δ	1,68726	0,825681
Q7VYS6	+	W_Δ	1,67056	1,13785
Q7VVK5	+	W_Δ	1,66505	0,693592
Q79GE3	+	W_Δ	1,66483	0,666578
Q7VTG5	+	W_Δ	1,63221	0,55273
Q7VTV4	+	W_Δ	1,62939	0,911921
Q7W018	+	W_Δ	1,62857	0,753389
Q7VT57	+	W_Δ	1,62758	0,831346
Q7VZG4	+	W_Δ	1,62621	-0,614578
Q7VYM1	+	W_Δ	1,61675	0,649096
Q79H42	+	W_Δ	1,61451	0,616373
Q7VW94	+	W_Δ	1,60388	-0,437592

P0A4H2			0,4087	0,329502
Q7VZK8			0,40603	0,132776
Q7VVU2			0,403488	0,199159
Q7VUE4			0,403144	0,345005
Q7VW26			0,402341	0,112891
Q7VW73			0,401227	0,238693
Q7VUU1			0,40055	0,48187
Q7W078			0,400203	0,299222
Q7VXB3			0,400039	0,29788
Q7VZA6			0,399589	0,28926
Q7VY37			0,397638	-0,41072
Q7VZD4			0,397495	0,156274
Q7VWM1			0,397152	-0,241002
Q7VUK1			0,395912	0,274024
Q7VSM0			0,395534	0,454335
Q7VV32			0,394848	0,397581
Q7VV94			0,393124	0,75104
Q7VYL3			0,392734	0,321297
Q7VZE8			0,392153	-0,573663
Q7VUH8			0,391698	0,63483
Q7VWK1			0,389728	0,324361
Q7VZK2			0,389535	0,271184
Q7VW67			0,389426	0,798354
Q7VWA1			0,388714	-0,348324
Q7VVU0			0,386193	0,331808
Q7VV03			0,385358	0,202143
Q7VWE2			0,385117	-0,663765

Q7W014	+	W_Δ	1,5998	0,470434
Q7VTJ7	+	W_Δ	1,59967	0,337358
Q7VXG6	+	W_Δ	1,59928	0,664793
Q7VY03	+	W_Δ	1,59294	0,73108
Q7VZA7	+	W_Δ	1,58502	1,31272
P33409	+	W_Δ	1,58003	0,652629
Q7VUM4	+	W_Δ	1,5755	1,3254
Q7VTF7	+	W_Δ	1,56611	0,433087
Q7VST5	+	W_Δ	1,56487	0,937327
Q7U358	+	W_Δ	1,5618	0,317602
Q7VSY7	+	W_Δ	1,54969	0,569094
Q7VSV5	+	W_Δ	1,54647	0,982654
Q7VUN9	+	W_Δ	1,54172	-0,46037
Q7VTE8	+	W_Δ	1,53384	0,392421
Q7VUX0	+	W_Δ	1,53351	1,24248
Q7VWJ0	+	W_Δ	1,53186	0,818297
Q7VTU4	+	W_Δ	1,53089	0,468734
Q7VSD5	+	W_Δ	1,52916	0,651793
Q7VUZ9	+	W_Δ	1,52516	0,740829
Q7TTH1	+	W_Δ	1,52347	1,33547
Q7W0A8	+	W_Δ	1,51869	1,1951
Q7W0D1	+	W_Δ	1,51539	0,617994
Q7VUW8	+	W_Δ	1,51213	1,1832
Q7VVN1	+	W_Δ	1,51116	0,743914
Q7VVY8	+	W_Δ	1,50947	0,616457
P04977	+	W_Δ	1,50843	0,898542
Q7VZQ0	+	W_Δ	1,50256	-0,364083

Q7VY76			0,384134	0,127145
Q7VZ05			0,384129	-0,348488
Q7VS35			0,383483	0,742139
Q7VU19			0,383015	0,180561
Q7VWE9			0,382929	-0,318117
Q7VWV8			0,37977	0,256815
Q7VW14			0,379474	0,775506
Q7VU60			0,378978	0,402406
Q7V SZ3			0,37821	0,32639
Q7W061			0,377503	0,209303
Q7VUF7			0,377322	0,334121
Q7VSD8			0,376678	0,239876
Q7VTM4			0,375501	0,4302
Q7VW70			0,373444	-0,61228
Q7VWI3			0,371271	0,601733
Q7VTD7			0,370889	-0,199022
Q7VSC7			0,370669	-0,257977
Q7VYA4			0,369822	-0,181417
Q7VU62			0,368287	0,270527
Q7VXY3			0,367297	-0,251173
Q7VXM6			0,367296	-0,371836
Q7VZP2			0,366142	-0,354252
Q7VYN2			0,365126	-0,15758
Q7VV37			0,363812	0,168655
Q7VUH9			0,363762	0,477694
Q7VXZ7			0,363103	0,267131
Q7VW64			0,362963	-0,785684

Q7VUF0	+	W_Δ	1,49722	0,522696
Q7VT84	+	W_Δ	1,49717	0,971714
Q7VUE3	+	W_Δ	1,49439	0,562734
Q7VVL2	+	W_Δ	1,48845	1,16122
Q7VTK7	+	W_Δ	1,48658	0,973959
Q7VX44	+	W_Δ	1,48513	-1,03249
Q7TTK0	+	W_Δ	1,48477	0,614416
Q7VZS5	+	W_Δ	1,45292	-0,437479
Q7VTD9	+	W_Δ	1,44781	0,550069
Q7W062	+	W_Δ	1,43373	0,472688
Q7VZY9	+	W_Δ	1,43251	0,679379
Q7VV41	+	W_Δ	1,43052	0,481189
Q7VVS6	+	W_Δ	1,4291	-0,356145
Q7VWS3	+	W_Δ	1,42869	0,689631
Q7VV00	+	W_Δ	1,42492	0,964527
Q79GJ5	+	W_Δ	1,42484	0,670866
Q7VZV0	+	W_Δ	1,41625	0,664136
Q7VYC7	+	W_Δ	1,41425	-0,773378
Q7VWM2	+	W_Δ	1,41297	0,596991
Q7VSQ6	+	W_Δ	1,40997	0,834691
Q7VWC1	+	W_Δ	1,4066	0,377453
Q7VSS1	+	W_Δ	1,40659	0,366023
Q79GQ4	+	W_Δ	1,40492	1,97774
Q7VZ70	+	W_Δ	1,40302	-0,387479
Q7VS28	+	W_Δ	1,40141	0,655315
Q7VXI2	+	W_Δ	1,40137	0,480144

Q7VSV0			0,361282	0,469141
Q7VWE6			0,360128	0,325623
Q7VUS3			0,358615	0,194076
Q7VYS1			0,35707	0,227146
Q7VSU1			0,35543	0,319345
Q7VWL9			0,353482	0,282121
Q7VV17			0,353154	-0,426385
Q7VUR2			0,351395	0,444145
Q7VWM6			0,35036	0,310396
Q7VTZ8			0,349765	-0,382436
Q7VTC6			0,349433	0,228829
Q7VZB9			0,34854	-0,262363
Q7VYQ8			0,345628	0,268873
Q7VY87			0,345264	0,249488
Q7VXD9			0,343977	0,247168
Q7VW87			0,342409	0,25657
Q45388			0,342341	-0,416489
Q7VY61			0,340582	0,729827
Q7VSK5			0,339178	0,399858
Q7VTM6			0,339024	0,367367
Q7VTC4			0,338987	0,253902
Q7VSH9			0,33839	0,297771
Q7VSH3			0,338016	-0,171458
Q7VUW7			0,335083	-0,332056
Q7VWQ7			0,33406	0,224223
Q7VXM2			0,332478	-0,35804

Q7VZV3	+	W_Δ	1,40118	0,245458
Q7VTI6	+	W_Δ	1,38609	0,727669
Q7VSW1	+	W_Δ	1,38113	0,510409
P67690	+	W_Δ	1,37994	1,16969
Q7VWZ4	+	W_Δ	1,37543	0,495852
Q7VV42	+	W_Δ	1,3546	1,69974
Q7VYL2	+	W_Δ	1,35299	0,598943
Q7VZT4	+	W_Δ	1,35072	2,2066
Q7VTA5	+	W_Δ	1,35061	0,531761
Q79GE2	+	W_Δ	1,34978	0,553885
Q7VTN6	+	W_Δ	1,34872	0,560994
Q7VY22	+	W_Δ	1,34818	0,380699
Q7W041	+	W_Δ	1,34532	0,419549
Q7VW93	+	W_Δ	1,33826	1,46883
Q7VUW3	+	W_Δ	1,33631	0,689507
Q7VS22	+	W_Δ	1,33207	-0,66331
Q7VYV2	+	W_Δ	1,31998	0,435421
Q7VUQ3	+	W_Δ	1,31935	0,808385
Q7VY97	+	W_Δ	1,31865	-0,449624
P04979	+	W_Δ	1,31738	1,00094
Q7W0D7	+	W_Δ	1,31278	-0,382181
Q7VU38	+	W_Δ	1,31093	1,68304
Q7VU91	+	W_Δ	1,30103	0,720215
Q7VZB8			1,29896	-0,539437
Q7VS27			1,29639	0,867524
Q7VST6			1,29211	0,548598
Q7VWW9			1,28833	0,581124

Q7VXN2			0,332287	0,168284
Q7VV73			0,330053	-0,40448
Q7VYQ9			0,329998	0,24532
P37369			0,329254	0,316752
Q7VYJ3			0,328294	-0,481742
Q7VZ55			0,327253	-0,189
Q7VYB7			0,325404	-0,233303
Q9X6Y8			0,322658	0,178459
Q7VSE2			0,322143	-0,245294
Q7VXA2			0,321687	0,241402
Q7VTD3			0,321406	0,238935
Q7VWP0			0,321266	-0,130289
Q7VXC5			0,32006	-0,498947
Q7VY32			0,318269	0,19174
Q7VSE6			0,317417	0,240806
Q79H25			0,31561	0,562444
P35077			0,315484	0,186214
Q7W010			0,315177	0,359484
Q7VUP9			0,31461	0,324595
Q7VZ61			0,314042	0,275087
Q7VVS5			0,313673	-0,229697
Q7VWK7			0,312643	-0,18759
Q7VZS4			0,312064	-0,220485
Q7VZ53			0,311304	0,343415
Q7W020			0,310765	0,48076
Q7VUW2			0,309696	0,159299
Q7VWF3			0,309594	0,230964

Q7VVJ8			1,27711	0,450935
Q7VVZ2			1,27626	-0,801764
Q7VW51			1,26892	0,439233
Q7VUP3			1,26781	0,373744
Q7VT91			1,26696	0,893044
Q7VUM8			1,25999	0,675948
Q7VU11			1,2495	0,97684
Q7VT92			1,24926	0,500525
Q7VZK1			1,24666	0,998017
Q7VWH1			1,24448	0,445331
Q7VXP5			1,24417	0,44009
Q7VSH2			1,23563	0,729509
Q7VVG5			1,23003	0,54483
Q7VSE9			1,22309	0,681862

Q7W0A7			0,309123	0,290402
Q7VY05			0,308082	-0,296227
Q7VUL5			0,307883	-0,241252
Q7W0J5			0,306553	0,271254
Q7VWE7			0,306063	0,180552
Q7VWV1			0,3057	0,178774
Q7VXD5			0,305451	0,317564
Q7VTK3			0,304957	0,168947
Q7VUM6			0,299419	0,362523
Q7VTJ3			0,299381	0,314806
Q7VWY1			0,298248	0,176559
Q7VZ18			0,297037	-0,230407
Q7VUU0			0,295493	0,525778
Q7VTC2			0,295425	0,329332

Q79GE6			1,2172	1,08988
Q7VYC0			1,21697	-0,425369
Q7VYH5			1,21636	0,627118
Q7VZR2			1,21557	0,408483
Q7VX99			1,20761	0,357174
Q7VTV0			1,19988	0,428581
Q7VTH6			1,19887	0,363477
Q7VYW4			1,19415	0,610354
Q7W0N0			1,18618	0,933962
Q7VW86			1,18414	0,559682
Q7VVB0			1,18385	0,632151
Q7VRY0			1,17237	0,649825

Q7VVR4			0,293176	0,152563
Q7VWZ0			0,293077	-0,272283
Q7VZI3			0,292292	-0,427358
Q79GX8			0,289114	0,26262
Q7W0P6			0,287654	0,174126
Q7VZX4			0,28693	-0,237798
Q7VSD1			0,286313	0,299622
Q7VW08			0,28582	-0,330369
Q7VWL3			0,283923	0,065474
Q7VXP6			0,281491	0,106536
Q7VZ72			0,281281	-0,718889
Q7VTQ9			0,281042	0,0938516

P0A3R5			1,17198	1,16602
Q79GQ0			1,16745	1,32674
Q7VU58			1,16719	0,629929
Q7W0Q0			1,16692	0,54799
Q79GQ5			1,16287	1,09141
Q7VW68			1,16076	0,460571
Q7VVX6			1,16014	0,811947
Q45338			1,16011	1,09977
Q7VTG3			1,15759	2,33811
Q7VZH1			1,15507	0,496356
Q7W0F1			1,15429	0,685375
Q7VVF5			1,15013	0,865578
Q79GE7			1,14943	0,669075
Q7VT96			1,14782	0,574212
Q7VWQ1			1,14472	0,54272
Q7VVG0			1,14456	0,599871
Q7VZU0			1,14411	-0,929711
Q7VT77			1,14118	0,548537
Q7VY36			1,13726	0,207995
Q7VTD8			1,13505	1,04649
Q7VV70			1,13499	0,512978
Q7VS85			1,13455	0,325467
Q7VUT8			1,13202	0,623879
Q7VTP7			1,13187	1,55051
Q7VWR4			1,13032	0,606422
Q7VWG5			1,12979	-0,412775
Q7VYH9			1,12918	-0,229856

Q7VW39			0,280332	0,143522
Q7VV79			0,280012	0,238863
Q7TTJ1			0,279892	0,25275
P33410			0,279681	-0,178647
Q7VTA2			0,278633	-0,220128
Q7VXE1			0,277995	-0,176714
Q7VTW2			0,277717	-0,180804
Q7VTB4			0,277153	-0,254009
Q7VTU2			0,27681	0,206321
Q7W083			0,276704	0,146069
Q7VW28			0,275923	-0,225847
Q7VXX2			0,275556	0,156557
Q7VTD5			0,275484	-0,288093
Q7VYD2			0,275229	-0,191653
Q7VTV5			0,274802	0,20481
Q7W0A9			0,274625	0,179229
Q7VY89			0,274228	-0,207349
Q7VUU5			0,274052	-0,335878
Q7VXT8			0,273739	-0,109912
Q7VYR2			0,273253	-0,352252
Q7VU43			0,271757	-0,251154
P0A448			0,270949	0,232413
Q7VVB6			0,269279	-0,251587
Q7VUV7			0,268906	0,154857
Q7VWS6			0,268659	-0,275983
Q7VY96			0,268461	0,302092
Q7VUW1			0,266654	0,205574

Q7VWY8			1,12796	0,657093
Q7VSZ8			1,12727	0,842837
Q7VT52			1,12589	0,517263
Q7VUE2			1,12143	0,649632
Q7VZM5			1,12121	0,414661
Q7VXK8			1,11835	1,02259
Q7VXH0			1,1169	0,300977
Q7VUV5			1,11659	0,611876
Q7VY56			1,11642	0,396983
Q7VYY7			1,1163	0,512094
Q7VYB5			1,11594	0,72584
Q7VZG7			1,11584	0,510192
Q7VWC4			1,1157	0,502712
Q7VUJ3			1,11258	0,742859
Q7VS64			1,1094	0,748005
Q7VYL5			1,10761	0,413464
Q7VXN4			1,10196	0,437886
Q7VUW9			1,10056	0,601708
Q7VSK4			1,09775	0,38297
Q7VZG3			1,08325	-0,47985
Q7VSD4			1,0815	0,723318
Q7VY64			1,07941	-0,892072
Q7VYK5			1,07864	0,423618
Q7VUN1			1,07751	-0,678483
Q7VSG4			1,07664	0,528716
Q7W0H1			1,0698	0,55698
Q7VXJ5			1,06923	-0,415312

Q7VU03			0,266621	0,142946
Q7VZB1			0,266359	0,368912
P66846			0,265294	0,163012
P0A323			0,263602	-0,383391
Q7VV04			0,263415	-0,321792
Q7VUE7			0,263051	0,287058
Q7W003			0,26272	0,21636
Q7VVV1			0,262197	0,238003
Q7VZJ6			0,261848	-0,344536
Q7VZC4			0,261174	-0,394314
Q7VX12			0,260998	-0,269118
Q7VXZ0			0,260583	0,217474
Q7VYP9			0,25985	-0,375499
Q7VUV4			0,259757	0,258799
Q7VTK5			0,257599	0,160784
P0A4E5			0,256291	-0,142318
P65622			0,255093	-0,296865
Q7VZX7			0,254624	0,208097
Q7VTA7			0,254536	-0,187265
Q7VVH3			0,253581	-0,278007
Q7VTH2			0,251891	0,206079
Q7VY68			0,25171	0,157403
Q7VWM3			0,251199	0,206151
Q7VXY4			0,250765	0,149795
Q7VZP7			0,249903	0,182513
Q7VS70			0,249668	-0,392105
Q7VSG5			0,248713	-0,223314

Q7VTB1			1,06451	0,69202
--------	--	--	---------	---------

Q7W069			0,248011	-0,293257
--------	--	--	----------	-----------

Q7VVG9			1,0589	0,32898
Q7VX67			1,0556	-0,573328
Q7VSP7			1,05487	0,73157
Q7W0C9			1,0542	0,594356
Q7VYD1			1,05335	0,347873
Q7W000			1,05318	0,284428
Q7VS71			1,05088	0,702059
Q7VZ22			1,0497	-0,722445
Q7VUY8			1,04882	0,913056
Q7W012			1,04759	0,553949
Q7VUW6			1,04558	0,434205
Q7VUA5			1,0421	0,59071
Q7VUM0			1,04104	0,443496
Q7VXI5			1,0404	0,710888
Q7W0D8			1,03406	0,583625
Q7VZU4			1,03002	-0,311156
Q7VZ75			1,026	0,631673
Q7VW25			1,02574	0,536416
Q7VZ03			1,02407	0,450603
Q7VW16			1,02236	0,741433
Q7VSY3			1,01747	0,550995
Q7VUE5			1,01703	0,817811
Q7VSN4			1,00883	0,401224
Q7VTF5			1,00862	0,747365
Q7VTN8			1,00638	0,765611

Q79H37			0,246005	-0,358818
Q7VVM3			0,245466	-0,373024
Q7W0D6			0,245453	-0,223747
Q7VY84			0,245183	-0,264695
Q7VZY7			0,245088	-0,173088
Q7VZ79			0,242359	0,150429
Q7W0F5			0,24202	0,442342
Q7VVSQ8			0,241618	0,195323
Q7VW74			0,241466	-0,258333
Q7VRY2			0,241046	-0,265083
Q7VYK8			0,240826	0,128445
Q7VY59			0,240216	0,226226
Q7VVA6			0,239913	-0,985304
Q7VZL2			0,239863	0,444779
Q7VU47			0,239292	0,257978
Q7VXD7			0,238571	-0,137123
Q7VWV5			0,238049	0,158303
Q7VTC9			0,237563	0,136351
Q7VU66			0,236481	-0,210714
Q7VW53			0,23614	0,209714
Q7VY92			0,235367	-0,0725145
Q7VSD3			0,234409	0,373466
Q7VW40			0,232368	0,297929
Q7W0M1			0,232046	-0,315288
Q7VZ50			0,231096	0,499863

Q79GQ3			1,00476	1,00364
Q7VYI0			1,00341	0,497937
Q7VTM1			1,00252	0,853992
Q7VVK4			1,00209	0,826121
Q7VWQ4			0,996791	0,425404
Q79GR7			0,995265	0,885942
Q79GN5			0,99359	0,180666
Q7VSY8			0,98931	0,70253
Q7VV96			0,984984	0,412434
Q7VWJ6			0,984442	0,632085
Q7VWA4			0,983044	-0,31557
Q7VW06			0,979601	0,724243
Q7W0J4			0,979407	1,21075
Q7VXC6			0,979337	0,704519
Q7VVJ2			0,975928	1,2178
Q7VV19			0,975783	0,379897
Q7VZ90			0,975669	0,895614
Q7VSH8			0,970827	-0,572073
Q7VT6			0,969879	1,35672
Q7VV16			0,967389	0,53771
Q7VTR4			0,966088	1,36205
Q7VTR7			0,960633	0,626892
Q7W0F9			0,958176	0,413138
Q79GM4			0,954869	0,506603
Q7VYX8			0,952569	-1,36973
Q7VZF6			0,950573	0,842248
Q7VX06			0,950176	-0,678698

Q7VVM4			0,230301	-0,296347
Q7VSE0			0,230009	0,286633
Q7VXD0			0,229737	-0,121933
Q7W0B0			0,229513	-0,214747
Q7VZ24			0,228128	0,183176
P0A4C5			0,227817	-0,141212
Q7W048			0,223441	-0,267757
Q7VVL1			0,223076	-0,404441
Q7VYZ9			0,22217	0,150303
Q7VYN6			0,22141	-0,107633
Q7VT03			0,221373	-0,247095
Q7VWL4			0,221129	-0,259395
Q7VTB6			0,220876	-0,127661
Q7W0S4			0,218499	0,164324
Q7VVJ7			0,217834	0,172512
Q7VYV4			0,217724	-0,187903
Q7VY01			0,217478	-0,45862
Q7VWI0			0,214968	-0,220801
Q7VYD7			0,214898	-0,148276
Q7VSY9			0,214443	0,198142
Q7VUS7			0,213925	-0,232782
Q7VVH2			0,213094	0,168559
Q7VX16			0,212426	-0,126473
Q7VXW3			0,212369	0,146442
Q7VYC8			0,211359	0,205518
Q7VV76			0,211152	-0,187137
Q7VXN6			0,209743	0,127009

Q7VS80			0,949411	0,787453
Q7VX91			0,946457	-0,610006
P0A3X2			0,94157	0,527852
Q7VYB3			0,936263	-0,623992
Q7VYH6			0,935366	0,472348
Q7VSQ9			0,934978	0,721239
Q7VSU4			0,93435	1,10222
Q7VWX5			0,933857	-0,386777
P48210			0,933851	-0,594015
Q7VUL2			0,928751	0,43014
Q7VY51			0,927861	0,55491
Q7W084			0,927769	1,22166
Q7VXG8			0,927015	0,513923
Q7VUA3			0,92684	0,597105
Q7W008			0,926265	0,509101

Q7VU48			0,208446	0,191688
Q7VXF8			0,205378	-0,188933
Q7VZF5			0,204455	-0,108064
Q7VUQ1			0,204274	0,263806
Q7VSW3			0,20388	0,177073
Q7VY34			0,202337	0,186918
Q7VTJ9			0,202291	-0,322682
Q7VZ35			0,201183	-0,229167
Q7VYR0			0,201149	-0,358345
Q7VUJ9			0,199818	-0,375301
Q7VUF5			0,197702	0,229061
Q7VTP8			0,197507	0,282669
Q7VU09			0,195024	-0,271034
Q7VSY5			0,194175	0,202981
Q7VWD8			0,19334	-0,228262

Q7VU97			0,925995	0,552758
Q7VSP0			0,920601	0,575592
Q79GQ6			0,918408	1,53568
Q7VTR2			0,917477	0,394915
Q7VXA0			0,916845	0,708313
Q7W0N4			0,916103	2,03228
Q7VWW5			0,913682	0,46309
Q7VU55			0,912235	0,498353
Q79H47			0,911554	0,184101
Q7VSB9			0,906856	2,38116
Q7VXK5			0,906819	0,260772

P0DKX7			0,192937	-0,594819
Q7VZB0			0,191039	0,0962338
Q7VW27			0,187622	0,194372
Q7VZN3			0,187448	0,348715
Q7VUG1			0,187034	-0,174426
Q7VWD4			0,186119	0,29877
Q7VVX5			0,183795	0,340481
Q7VZ52			0,183556	0,287676
Q7VV50			0,183518	-0,18912
Q7VW97			0,183273	0,129724
Q7VZN4			0,180331	-0,140002

Q7VTF8			0,906741	0,413772
Q7VY31			0,901347	0,475316
Q7VSM1			0,901158	0,585885
Q7VXN3			0,901113	1,44138
Q7VVU3			0,899498	-0,583325
Q7VUL1			0,897593	0,485005
Q7VY02			0,896208	0,751495
Q7VSQ5			0,895981	0,460662
Q7W050			0,89268	0,303222
Q7VZY6			0,891687	0,373409
Q7VZC9			0,888023	-0,945995
Q7W0S8			0,885642	0,337246
Q7VT29			0,883832	0,495965
Q7VU27			0,882675	0,235459
Q7VTS5			0,880773	0,369298
Q7VV86			0,876977	0,724327
Q7VZU5			0,875334	0,425413
Q7VTN3			0,872268	0,496656
Q7VSH0			0,871216	0,465435
Q7VYZ8			0,86942	0,507671
Q00879			0,866043	0,238134
Q7VVS3			0,86419	0,464962
Q7VWF9			0,863654	0,223784
Q7VX03			0,863179	0,334886
Q7VV99			0,860321	0,445392
Q7VSU2			0,859866	1,07527
Q79GP4			0,85859	1,47022

Q7VW77			0,180116	0,0932069
Q7VXB8			0,179366	0,199345
Q7VTQ8			0,179126	0,119021
Q7VY27			0,178719	0,186979
Q7VXW0			0,178333	0,173329
Q7VZ17			0,17746	-0,202133
Q7VTB5			0,176871	0,193002
Q7VY42			0,176422	-0,12855
Q7VYH8			0,174936	0,152961
Q7VY08			0,174912	0,247953
Q7VUS5			0,174679	-0,308766
Q7VZC8			0,174583	0,0955911
Q7VZF1			0,174469	0,12744
Q7VXF6			0,174337	-0,223436
Q7VTR0			0,174119	0,208072
Q7VU82			0,173998	0,0563073
Q7VW38			0,173593	0,194563
Q7VW91			0,173268	0,148747
Q7VUP4			0,172755	0,275694
Q7VUH5			0,171926	0,235017
Q7VZ56			0,169279	0,136348
Q7VSH4			0,168933	0,108108
Q7VXG7			0,166796	-0,391827
Q7VSG1			0,166611	0,249295
Q7VU52			0,165006	0,182081
Q7VS29			0,162321	0,241592
Q7VZN1			0,162309	0,156246

Q7VZ16			0,858066	-0,639246
Q7VW37			0,857153	0,38468
Q7VTB0			0,856586	0,542371
Q7VWY2			0,855131	0,463411
Q7VWF8			0,853782	1,06917
Q7W0K8			0,850658	0,192544
Q7U364			0,848601	0,307846
Q7VXG9			0,844442	0,330207
Q7VX60			0,842457	0,339118
A0A0H3LR85			0,841123	0,546874
Q7VXI8			0,840546	-0,914639
Q7W0L1			0,839514	0,474714
Q7VTG4			0,838994	0,709055
Q7VZC3			0,838519	-0,829528
Q7VU72			0,838297	0,557398
Q7VTM5			0,838033	1,3862
Q7W007			0,836915	0,295647
P0A320			0,836528	0,40655
Q7U359			0,834886	0,154986
Q7W080			0,834604	-1,28843
Q7VTM9			0,832044	0,47603
Q7VRZ2			0,830162	0,312434
Q7VU20			0,829885	0,376602
Q7VV83			0,827499	0,767312
Q7W0S5			0,825148	1,66049
Q7VV98			0,82442	0,450481
Q7VRZ5			0,819231	0,661677

Q7VX14			0,161417	-0,156944
Q7VZU1			0,161007	0,163718
Q7VTE9			0,159964	0,400643
Q7VWB6			0,159489	0,141293
Q7VSW7			0,156189	0,326882
Q7VUK0			0,155801	-0,126917
Q7VVE7			0,155698	0,11415
Q7VZX5			0,153392	0,120651
Q7W0G6			0,152573	0,174293
Q7VVR3			0,152547	0,124297
Q7VWA2			0,151937	-0,107156
Q7VY35			0,150782	0,0395994
Q7VYT6			0,150765	-0,10769
Q7VZF3			0,150525	-0,0859046
Q7VTC8			0,150013	-0,105625
Q7W0R9			0,147355	-0,0945916
Q7VYB4			0,146724	0,188207
Q7VYP8			0,146635	0,0909109
Q7VU54			0,145985	-0,318552
Q7VXF5			0,145782	-0,261569
Q7VYX5			0,145371	0,14177
Q7VV14			0,145115	0,0755138
Q7VW03			0,14482	0,0872874
Q7VXW5			0,142618	0,0821776
Q7VW20			0,14162	0,122938
Q7VVG2			0,141463	0,137101
Q7VWL6			0,140095	-0,101443

Q7VUA2			0,816347	1,41865
Q7VWZ2			0,815878	0,336007

Q7VZ00			0,139359	0,290408
Q7VYC2			0,139325	-0,0956612

Q7VUN4			0,814837	0,446039
Q79H45			0,814342	0,496911
Q7VU92			0,814004	0,620328
Q7VT25			0,813961	0,613253
Q7VWX0			0,813577	0,67756
Q7VS68			0,811248	1,04156
Q7VT26			0,807119	1,3988
Q7VYM2			0,806926	0,336186
Q7VUH3			0,804978	0,579001
Q7VVE5			0,802531	0,518678
Q7VVQ9			0,799219	0,47466
P40415			0,797235	0,518466
Q7VUP6			0,795888	0,590772
Q45340			0,7919	0,298945
Q7VXF9			0,789507	0,532948
Q7VSZ2			0,787907	0,534301
Q7VVD8			0,787876	0,418791
Q7VVF4			0,787186	0,419996
Q7VWB2			0,786793	0,433419
Q7VUP1			0,786002	0,388177
Q7W0Q1			0,783614	0,216256
Q7VXC3			0,783398	-0,994378
Q7VUN8			0,782163	0,817242
Q7VW33			0,779835	-0,4371

Q7VT06			0,13901	0,0854878
Q7VUG2			0,137324	-0,177136
Q7VWL7			0,137272	0,100984
Q08530			0,135899	-0,10316
Q7VZ76			0,135662	0,567987
Q7VW31			0,135582	0,137496
Q7VUQ7			0,134263	0,208745
Q7VYR4			0,133879	-0,121166
Q7VXD4			0,133063	-0,0966234
Q7W0I4			0,132192	0,175885
Q7VY70			0,132077	-0,138979
Q7VUS9			0,131527	-0,146737
Q7VTB9			0,131403	0,0958195
Q7W018			0,130967	-0,119761
Q7VW30			0,130326	-0,0732093
Q7VSR6			0,130238	0,162331
Q7VU18			0,130143	0,173445
Q7VXM4			0,129098	0,0908127
Q7VSA8			0,128994	-0,182764
Q7VZM9			0,128545	0,0768743
Q7VV80			0,12811	0,13175
Q7VYL4			0,126622	-0,121468
Q7VY72			0,125823	-0,0845466
Q7VV55			0,125738	0,100544

Q7VSV7			0,776598	0,717899
Q7VSW2			0,77491	0,622368
Q7VZE6			0,772707	0,463784
Q7VY60			0,770839	0,347576
Q7VRZ4			0,770701	0,298285
Q7VTI3			0,767832	0,410824
Q7VSV3			0,766847	0,623959
Q7U357			0,766316	0,465695
Q7W0H0			0,765209	0,483765
Q7VWW4			0,763794	0,217755
Q7VT04			0,763774	-0,259699
Q7VXL0			0,76011	0,724553
Q7VU67			0,75955	0,445643
Q7VY28			0,758713	-0,701701
Q7W001			0,755035	-0,651115
Q7VTL3			0,754513	0,944878
Q7W0G8			0,753986	-0,747145
Q7VSM2			0,752699	0,450576
Q7VVJ6			0,748929	-0,350498
Q7VYU6			0,74367	0,395899
Q7VZT0			0,741543	0,908856
Q7VVT8			0,741192	0,88478
Q79GP9			0,739569	0,761368
Q7VS92			0,735118	0,334258
Q7VS43			0,734741	0,191078
Q7VX85			0,73342	0,785329
Q7VXX6			0,731529	-0,911515

Q7VWL2			0,125713	0,136962
Q7VU04			0,125047	0,11939
Q7VWX9			0,124873	0,0850201
Q7VZ80			0,123679	0,246074
Q7W0D5			0,122999	-0,115425
Q7VXM0			0,122816	0,104274
Q7VZT1			0,122175	0,101252
Q7W0L2			0,122159	0,173559
Q7VZU8			0,121608	0,221017
Q7VXH4			0,121419	-0,192372
Q7W0F7			0,121126	-0,161342
Q7VTB7			0,120933	-0,0834599
Q7VXJ6			0,11993	0,195848
Q7VU53			0,119743	-0,204111
Q7VWL8			0,119316	0,0588298
Q7VVA1			0,119163	-0,148178
Q7W0C8			0,116792	0,132378
Q7VY09			0,116436	0,0694337
Q7VW07			0,116404	0,200952
Q7VXC7			0,115177	0,0832181
Q7VWK6			0,115032	0,198454
Q7VY63			0,114619	-0,0575294
Q7W0G3			0,113575	0,202572
Q7VYZ3			0,111869	-0,081686
Q7VTF3			0,111593	0,156038
Q7VUG6			0,111183	-0,0917048
Q7VZ36			0,111089	0,160369

Q7VYQ2			0,728534	0,856059
Q7VU14			0,728533	0,39244
Q7VWU8			0,726592	-0,317245
Q7VVF8			0,726317	0,687035
Q7VV58			0,72549	0,762696
Q7VZ27			0,725137	-0,559936
Q7VZU9			0,720036	0,532666
Q7VYS2			0,718945	-0,165049
Q7VU05			0,718857	0,718601
Q7VT13			0,718093	0,448739
Q7VSV1			0,71781	0,481716
Q7VTE4			0,71581	0,444777
Q7VTQ0			0,714637	0,445113
Q7VW21			0,708837	0,359929
Q7VXX1			0,707624	0,913812
Q7VYT9			0,70513	0,549812

Q7VZ34			0,110415	0,0724015
Q7VZD8			0,109733	-0,0898843
Q7VU12			0,109269	-0,115657
Q7VTV8			0,109022	0,159056
Q7VVY3			0,108511	0,152346
Q7VYM8			0,108095	0,0704269
Q7VX94			0,108051	0,128431
Q7VY06			0,107473	-0,136783
Q7VT71			0,106868	-0,122224
Q7VW32			0,106775	0,100582
Q7VT27			0,106769	-0,136744
Q7VU65			0,105592	0,158802
Q7U365			0,102786	-0,0714641
Q7VUV6			0,102465	-0,122599
Q7VZ86			0,10244	-0,132944
Q7VY44			0,102171	-0,0248942

Q7VTJ8			0,703606	0,333903
Q7VYR3			0,703256	-0,556668
Q7W0M7			0,702554	0,8696
Q7VTR9			0,702006	0,216072
Q7VU16			0,701702	0,465354
Q7VV09			0,701571	0,406848
Q7VYM6			0,700248	0,421899
Q7VU44			0,698601	-0,596131
Q7VU29			0,698399	0,346426
Q7VY73			0,697939	0,148993

Q7VS74			0,102083	-0,0796418
Q7VTF1			0,100946	-0,0947113
Q7VTS0			0,100591	0,173214
Q7W0R8			0,100401	-0,0833364
Q7VUG0			0,100112	-0,07338
Q7VS41			0,0988564	-0,161954
Q7VTC5			0,0975886	0,13211
Q7VVG8			0,0973997	-0,124245
Q7VWX6			0,0966839	-0,0623021
Q7VUP5			0,0965375	0,0642962

Q7VYP5			0,694231	-0,357094
Q7VT00			0,693312	0,879421
Q7VZC0			0,6923	-0,851683
Q7VU41			0,691534	0,266404
P12421			0,68815	-0,420287
Q7VXZ3			0,686979	0,463033
Q7VY74			0,685178	0,338331
Q7VWC2			0,683476	0,382107
Q7VSY6			0,683063	0,449136
Q7VVV2			0,681002	0,740912
Q7VZN2			0,680904	0,300241
Q7VYQ6			0,680823	-0,403787
Q7VZV1			0,680224	0,338012
Q7W0B5			0,678169	0,92053
Q7VTF6			0,676511	0,307601
Q7VT07			0,674687	0,326924
Q7VU64			0,673391	-0,603354
Q7VZ37			0,672492	-0,801392
Q7VVG6			0,671712	-0,4828
Q7W0L3			0,661545	0,38646
Q7VZM8			0,659486	-0,438784
Q7VW96			0,65669	-0,277234
Q7VRX6			0,656163	0,336496
Q7VYT7			0,654983	-0,195701
Q7VS00			0,65413	0,969131
Q7VX09			0,652313	0,333006
Q7VXK3			0,651919	-0,550179

Q7VTA1			0,096067	-0,062088
Q7VTL8			0,0949523	0,191881
Q7VUP2			0,0944899	0,0397439
Q7VY71			0,0936236	-0,0609379
Q7VYB8			0,0934651	-0,0625911
Q7VTZ7			0,0933978	0,109637
P12255			0,0924342	0,0784421
Q7VWW0			0,0922932	0,0781245
Q7VVU6			0,0920073	0,0462923
Q7VST9			0,0916837	0,159654
Q7VUV8			0,0913548	0,0942292
Q7VSZ1			0,0912281	-0,133961
Q7VUT1			0,0897329	0,0542736
Q7VXI7			0,0884382	-0,0866218
Q7VTB3			0,0879392	0,0961781
Q7VZ46			0,0877789	0,219622
Q7W0S3			0,0872872	-0,0592737
Q7U361			0,0866043	0,0658317
Q7VXP8			0,0859181	-0,0688725
Q7VXH5			0,0855701	0,0519085
Q7VVV3			0,0846357	0,078764
Q7VUK2			0,0838762	-0,100621
Q7W011			0,0833961	-0,145776
Q7VUF4			0,0813097	-0,115319
Q7VVC8			0,0807593	0,0462055
Q7VZZ7			0,0800517	0,068078
Q7VZQ3			0,0796557	0,0628667

Q7VVU5			0,651489	-0,18988
Q7VW71			0,651085	0,700577
Q7VSN0			0,649806	0,561997
Q7VT45			0,648954	0,232044
Q7VUA1			0,647566	0,35535
Q7VXK2			0,647181	0,197567
Q7VYK3			0,645359	0,798362
Q7W094			0,64006	0,757748
Q7VYR6			0,639606	-0,486394
Q7VXG5			0,638065	0,403456
Q7VSZ7			0,634833	0,380729
Q7VXF7			0,632774	-0,160508
Q7VVE9			0,632352	0,403508
Q7VSR1			0,629195	0,466262
Q7VTK4			0,628309	0,396994
Q7VTD0			0,62616	-0,236672
Q7VSN5			0,622374	0,286804
Q7VYV6			0,621167	-0,623279
Q7W023			0,618037	-0,264935
Q7VYS5			0,616667	0,430515
Q7VVY2			0,615548	-0,699325
Q7VYN1			0,61428	-0,372169
Q7VZG5			0,614173	-0,736186
Q7VSZ9			0,612613	0,235416
Q7VXW9			0,612208	0,433587
Q7VZY4			0,604037	0,360681
Q7W081			0,602957	0,368717

Q7VZF0			0,0796082	0,0536442
Q7VZE0			0,0784496	-0,088635
Q7VTA8			0,0781098	0,0641179
P0A339			0,0775436	0,0645123
Q7VUW5			0,077432	-0,0415463
Q7W0A4			0,0769115	0,134409
Q7VUT2			0,0765352	-0,061727
Q7VXZ4			0,0759384	0,27786
Q7VWL1			0,0753836	0,195411
Q7VV91			0,0746239	0,0652637
P56865			0,0744972	0,147428
Q7VWD2			0,0731234	-0,0317969
Q7VWW1			0,0730626	-0,0819263
Q7W079			0,0726953	0,123242
Q7VUD9			0,0716373	0,116661
Q7VTD6			0,0712982	-0,0600286
Q7VX61			0,0706207	0,106247
Q7VY83			0,0702028	0,0460072
Q7VYS7			0,0693105	0,0559025
Q7VV87			0,0693075	-0,072042
Q7VTA4			0,066639	-0,111856
Q7VZU6			0,0635539	-0,0901971
Q7VZ15			0,0635482	0,0858459
Q7W0E5			0,0632408	-0,0478334
Q7VSG0			0,0625007	-0,0851464
Q7VYB9			0,0620926	0,0310435
Q7VVA2			0,0615845	-0,0508938

Q7VYN5			0,602585	-0,164743
Q7VXX8			0,602357	0,280857
Q7VS21			0,6021	0,249373

Q7VS87			0,0615547	-0,0368176
Q7VW58			0,0611966	-0,0848813
Q7VYC9			0,0603872	-0,0402589

Q7VXY8			0,601337	-0,677739
Q7VWY4			0,600016	0,288766
Q7VXN0			0,599755	0,36105
Q7VWA8			0,599383	0,436433
Q7VV43			0,598311	0,445753
Q7VVA0			0,597926	0,240718
Q7VW79			0,597151	-0,352955
Q7VVI6			0,59712	0,264298
Q7VU46			0,596376	-0,869771
Q7W019			0,592032	-0,563108
Q7VVR6			0,591778	0,387194
Q7VSL9			0,590528	0,537017
Q7VTS2			0,590396	0,802398
Q7VZ84			0,58873	-0,70358
Q7VSF2			0,586845	-0,695715
Q7VV26			0,586624	0,386567
Q7VSP8			0,586327	0,409446
Q7W0S6			0,586291	0,665968
Q7VY26			0,586272	-0,30882
Q7VSA4			0,581332	0,413297
Q7VVA9			0,580997	0,337093
Q7VTP3			0,580147	0,57807
Q7VVC9			0,579453	0,328323

Q7W0N9			0,0603404	-0,0459981
Q7VV05			0,0601796	-0,0388379
Q7VTC7			0,0589796	-0,0446067
Q79GP1			0,0577534	-0,071424
Q7VVV4			0,0573022	0,0449181
Q7VY75			0,0566625	-0,0707617
Q7W0S2			0,0557068	-0,046823
Q7VS95			0,0555123	0,0701404
Q7VRY1			0,0539199	-0,0199585
Q7VY99			0,0533989	0,0504904
Q7VV20			0,0533391	-0,0675063
Q7VTE3			0,0528985	0,0435886
Q7VXA4			0,0524469	0,056757
Q7VRX7			0,0517541	-0,070004
Q7VUH2			0,050592	0,033484
Q7VTF2			0,0502881	-0,0631227
Q7VYA3			0,0497702	0,0458174
Q7VZL3			0,0468969	0,0407543
Q7VW88			0,0466995	0,0638604
P81549			0,0466451	-0,0871587
Q7VTU6			0,046577	-0,0672913
Q7VUQ4			0,0461948	-0,0663114
Q7VTD4			0,0460555	-0,0388117

Q7W0G5			0,579313	-0,227054
Q7W0F2			0,578203	0,439018
Q7VVI2			0,578106	0,172207
Q7VU86			0,574244	-0,663247
Q7VUQ5			0,572129	0,379052
Q7VTT5			0,570797	0,265285
Q7VZT6			0,567441	-0,189015
Q7VT64			0,56676	1,0082
Q7VU31			0,565364	-1,14664
Q7VYL8			0,55754	0,440279
Q7W0E2			0,555386	1,43038
Q7VWY7			0,554709	-0,414485
Q7W0A2			0,554673	-0,674535
Q7VYX6			0,553723	0,336775
Q7VYR5			0,552175	-0,503121
Q7VXD8			0,550724	0,278252
Q7W0A3			0,550538	0,368032
Q7VXL9			0,550524	-0,714474
Q7VW48			0,548972	-0,5511
Q7VS88			0,546762	0,202617
Q7VV88			0,546592	-0,234186
Q7VV75			0,546248	-0,298282
Q7VZA9			0,54585	0,257294
Q7VSN1			0,54579	0,394356
Q7VTN5			0,543846	0,629758
Q7W0E8			0,543773	-0,483111
Q7VSN3			0,543435	-0,558746

Q7VV07			0,0457407	-0,0471139
Q7VVY0			0,0455484	0,0563216
Q7VYC1			0,0455277	0,0532775
Q7VV97			0,0452818	0,0823784
Q7VUW0			0,0452308	-0,0374465
Q7VSU7			0,0448561	-0,0650735
Q7VTB2			0,0444747	0,0371146
Q7VUU6			0,0439113	0,0869536
Q7VWR0			0,0434269	0,100749
Q7VXA7			0,0428985	0,031208
Q7W0M8			0,0416246	-0,0764742
Q7VU81			0,0415505	0,021029
Q7VVI7			0,0410552	-0,0574532
Q7VZ25			0,040667	0,0325294
Q7W0Q5			0,0390361	-0,0329437
Q7VY13			0,0385254	0,0528111
P41399			0,0375503	-0,0287752
Q7VVR5			0,0375014	-0,0549698
Q7VV46			0,0374401	-0,0226531
Q7VSA2			0,0374021	0,0228224
Q7VVH7			0,0366657	0,0349054
Q7VSR5			0,036632	-0,0352888
Q7VZE7			0,0362018	0,0164948
Q7VXZ8			0,0358454	-0,0501108
Q7VX98			0,0355955	-0,0432205
Q7VUS8			0,0350794	-0,0518746
Q7VY14			0,0346761	0,051434

Q7VSJ3			0,542701	0,280797
Q7VUL8			0,542056	-0,533507
Q7VX45			0,538671	0,593489
Q7W0C4			0,538198	0,436999
Q7VWC8			0,537289	0,418375
Q79GS0			0,533044	0,490178
Q7VZG0			0,532991	-0,654109
Q7VST0			0,531655	0,320929
Q7VS24			0,531603	0,523303
Q7W0A0			0,531525	0,396884
Q7VV10			0,530037	0,519773
Q7VYC6			0,529601	0,446478
Q79H48			0,526666	0,354301
Q7VWJ2			0,525722	0,290946
Q7VS15			0,524824	0,341695
Q7VWE8			0,524348	-0,415783
Q7VUQ9			0,523476	0,428156

Q7W0K0			0,033444	-0,0537724
Q7VTD2			0,0329202	0,0334191
Q7VWM5			0,0329098	-0,0492644
Q7VT65			0,0328414	-0,0336423
Q7VXM1			0,0327913	-0,0235562
Q7VTC1			0,0320844	-0,0310526
Q7VYV9			0,0319612	0,0214067
P17835			0,0317396	0,0231566
Q7VTC0			0,031661	-0,0306001
Q79GT7			0,0315714	0,0172372
Q7VTL7			0,0314734	-0,0273814
Q79GN7			0,0313044	0,0575314
Q7VYN8			0,0304864	-0,0338979
Q7VWC5			0,0285852	0,0757899
Q7VVC4			0,0285516	0,0597548
Q7VZE9			0,02794	0,026371
Q7VX20			0,026713	-0,0202904

Q7VYC3			0,523238	-0,42783
Q7VZ83			0,522549	-0,370632
Q7VYC4			0,522208	-0,244003
Q7VUY1			0,521826	0,901549
P0A3E3			0,519467	0,236019
Q7VWE5			0,519421	0,263513
Q7VZB3			0,518961	0,327736
Q7VXH1			0,518487	-0,193239
Q7VZJ2			0,516947	0,344186

Q7VV92			0,0264486	0,0233784
Q7VZC7			0,023927	0,0204844
Q7VYD4			0,0231631	0,0465841
Q7W0E4			0,0227324	-0,0316496
Q7VW29			0,0217609	-0,0213928
Q7VZQ4			0,0214564	-0,0130043
Q7VZP4			0,0213118	0,0538173
Q7VYV3			0,021076	0,00733614
Q7W0S0			0,0207443	-0,0142155

Q7VUJ8			0,516372	0,424742
Q7VTG7			0,515251	0,504725
Q7VYS3			0,514907	-0,345522
Q7VS39			0,513157	0,511215
Q7W0K2			0,512597	0,439198
Q79H36			0,512192	0,153742
Q7VT61			0,511979	0,804103
Q7VU01			0,510765	0,45147
Q7VZ58			0,510491	0,753329
Q7VZS7			0,510271	0,47611
Q7VVY1			0,510157	0,816551
Q7VVY4			0,510079	-0,599708
Q7VWL5			0,509601	0,259645
Q7VZV5			0,509505	0,390368
Q7VU70			0,509455	0,169173
Q7VX43			0,508103	-0,30428
Q7VU85			0,507181	0,131186
Q7VSQ7			0,506482	-1,01114
Q7VZQ2			0,506118	-0,390603
Q7VZ89			0,503672	0,198314
Q7VZ62			0,503274	0,668269
Q7VTP4			0,502663	0,421845
Q7VT67			0,499294	0,171412
Q7VSI9			0,498969	0,44503
Q7VXD2			0,497946	0,431815
Q7VTM8			0,495993	0,717381
Q7VZX2			0,494784	0,341578

Q7VRZ3			0,0204004	-0,0340004
Q7VYA8			0,0201779	-0,0171242
Q7VZR1			0,0198585	-0,0337386
Q7VTD1			0,0188819	0,0171556
P14283			0,0187353	-0,0111704
Q7VXM9			0,0185595	-0,016922
Q7VU45			0,0184405	0,0156937
Q7VT97			0,0178858	-0,0126395
Q7TT91			0,0173462	-0,0196018
Q7VU94			0,0162675	-0,0158463
Q7VYD0			0,0159201	0,00865412
Q7VWL0			0,0152353	0,0122294
Q7VRZ6			0,015179	0,0153728
Q7VZ81			0,0144135	-0,0308003
Q7VZ59			0,0136618	-0,0245943
Q7VZG2			0,0135879	0,0100303
Q7VVR1			0,0129398	0,0122418
Q7VTA6			0,0123693	0,0108552
Q7VSP3			0,0119963	-0,0133338
Q7VZ57			0,0104729	-0,0127077
Q7VVB8			0,00898812	0,00773191
Q7VTU1			0,00822084	0,0103483
Q7VT90			0,00755632	-0,0043292
Q7VZX6			0,00747651	0,00912952
Q7VYA5			0,0070318	-0,00579309
Q7VS44			0,00566855	0,00679588
P05788			0,00563822	0,00505733

Q7VS65			0,494592	0,34277
Q7VV18			0,494089	0,31701
Q7VSU0			0,493729	0,55073
Q7VS82			0,492475	0,233223
Q04064			0,490838	0,278257
Q7VZP9			0,486384	-0,325255
Q7VYA2			0,48553	0,47706
Q7VZ63			0,484734	0,76366
Q7VS51			0,483415	0,442416
Q7VW65			0,483158	-0,352278
Q7VZG1			0,482925	0,445692
Q7W0P5			0,482747	0,452795
Q7VWW2			0,482119	0,277326
Q7VVI5			0,481434	0,200912

Q7VWF0			0,00557875	0,0113425
Q7W0M3			0,00540065	-0,00741863
Q7VWX2			0,00518978	-0,00518608
Q7VZQ1			0,00501815	0,00389051
Q7VS46			0,00370223	0,00192928
Q7VW76			0,00329805	-0,00538588
Q7VXI6			0,00324662	0,00632095
Q7VZD6			0,00305801	-0,00295734
Q7VW69			0,00283863	-0,00447798
Q7VX96			0,00253577	-0,0058198
P0A352			0,00208701	0,0019002
Q7VUV9			0,00170471	0,00171661
Q7VZT5			0,00163721	0,00146151
Q7VXG4			0,00142719	0,0015192
Q9X6Y9			0,000904149	-0,00066948

Bibliografía

1. Mattoo S, Cherry JD. Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella pertussis* and Other *Bordetella* Subspecies. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(2):326-382. doi:10.1128/CMR.18.2.326-382.2005
2. Gross R, Keidel K, Schmitt K. Resemblance and divergence: the “new” members of the genus *Bordetella*. *Med Microbiol Immunol.* 2010;199(3):155-163. doi:10.1007/S00430-010-0148-Z
3. Ko KS, Peck KR, Oh WS, Lee NY, Lee JH, Song JH. New Species of *Bordetella*, *Bordetella ansorpii* sp. nov., Isolated from the Purulent Exudate of an Epidermal Cyst. *J Clin Microbiol.* 2005;43(5):2516. doi:10.1128/JCM.43.5.2516-2519.2005
4. Hertle A, Hinz KH. [Serologic studies on the antigen structure of *Bordetella avium* sp. nov.]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 1984;97(2):58-60. Accessed January 6, 2023. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6712582/>
5. Vandamme PA, Peeters C, Cnockaert M, et al. *Bordetella bronchialis* sp. nov., *Bordetella flabilis* sp. nov. and *Bordetella sputigena* sp. nov., isolated from human respiratory specimens, and reclassification of *Achromobacter sediminum* Zhang et al. 2014 as *Verticia sediminum* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015;65(10):3674-3682. doi:10.1099/IJSEM.0.000473
6. Ferry NS, Noble A. Ozena and Distemper: Comparative Study of *Coccobacillus foetidus-ozanae* and *Bacillus bronchisepticus*. *J Bacteriol.* 1918;3(6):499-508. doi:10.1128/JB.3.6.499-508.1918
7. Cookson BT, Vandamme P, Carlson LC, et al. Bacteremia caused by a novel *Bordetella* species, “*B. hinzii*.” *J Clin Microbiol.* 1994;32(10):2569-2571. doi:10.1128/JCM.32.10.2569-2571.1994
8. Weyant RS, Hollis DG, Weaver RE, et al. *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. *J Clin Microbiol.* 1995;33(1):1-7. doi:10.1128/JCM.33.1.1-7.1995
9. Eldering G, Kendrick P. BACILLUS PARA-PERTUSSIS: A SPECIES RESEMBLING BOTH BACILLUS PERTUSSIS AND BACILLUS BRONCHISEPTICUS BUT IDENTICAL WITH NEITHER. *J Bacteriol.* 1938;35(6):561-572. doi:10.1128/JB.35.6.561-572.1938
10. Bordet J, Gengou O. Le microbe de la coqueluche. *Bull Acad R Med Belg.* Published online 1906. Accessed February 27, 2023. <http://hdl.handle.net/2013/>
11. Ivanov Y V., Linz B, Register KB, et al. Identification and taxonomic characterization of *Bordetella pseudohinzii* sp. nov. isolated from laboratory-raised mice. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016;66(12):5452-5459. doi:10.1099/IJSEM.0.001540
12. Tran TD, Ali MA, Lee D, Félix MA, Luallen RJ. Bacterial filamentation as a mechanism for cell-to-cell spread within an animal host. *Nat Commun.* 2022;13(1). doi:10.1038/S41467-022-28297-6
13. Vandamme P, Heyndrickx M, Vancanneyt M, et al. *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Rügger and Tan 1983. *Int J Syst Bacteriol.* 1996;46(4):849-858. doi:10.1099/00207713-46-4-849
14. Tazato N, Handa Y, Nishijima M, Kigawa R, Sano C, Sugiyama J. Novel environmental species isolated from the plaster wall surface of mural paintings in the Takamatsuzuka tumulus: *Bordetella muralis* sp. nov., *Bordetella tumulicola* sp. nov. and *Bordetella tumbae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015;65(12):4830-4838. doi:10.1099/IJSEM.0.000655/CITE/REFWORKS

15. von Wintzingerode F, Schattke A, Siddiqui RA, Rösick U, Göbel UB, Gross R. *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51(Pt 4):1257-1265. doi:10.1099/00207713-51-4-1257
16. Loch C, Antoine R, Jacob-Dubuisson F. *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Curr Opin Microbiol*. 2001;4(1):82-89. doi:10.1016/S1369-5274(00)00169-7
17. Parkhill J, Sebahia M, Preston A, et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet*. 2003;35(1):32-40. doi:10.1038/ng1227
18. Linz B, Ma L, Rivera I, Harvill ET. Genotypic and phenotypic adaptation of pathogens: Lesson from the genus *Bordetella*. *Curr Opin Infect Dis*. 2019;32(3):223-230. doi:10.1097/QCO.0000000000000549
19. Taylor-Mulneix DL, Bendor L, Linz B, et al. *Bordetella bronchiseptica* exploits the complex life cycle of *Dictyostelium discoideum* as an amplifying transmission vector. *PLOS Biol*. 2017;15(4):e2000420. doi:10.1371/JOURNAL.PBIO.2000420
20. 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. *J Bacteriol*. 1997;179(21):6609-6617. doi:10.1128/JB.179.21.6609-6617.1997
21. Lauria AM ZC. Pertussis - StatPearls - NCBI Bookshelf. Accessed February 9, 2023. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519008/#_NBK519008_pubdet_
22. Guiso N, Gallais JL, Gavazzi G, Pinquier D, Gaillat J. Incidence of pertussis in subjects aged 50 years and older in France in 2013–2014. *Médecine Mal Infect*. 2018;48(1):30-36. doi:10.1016/J.MEDMAL.2017.09.002
23. Trollfors B. *Bordetella Pertussis* Whole Cell Vaccines—Efficacy and Toxicity. *Acta Paediatrica*. 1984;73(4):417-425. doi:10.1111/J.1651-2227.1984.TB09949.X
24. Kuchar E, Karlikowska-Skwarnik M, Han S, Nitsch-Osuch A. Pertussis: History of the disease and current prevention failure. *Adv Exp Med Biol*. 2016;934:77-82. doi:10.1007/5584_2016_21/COVER
25. Sato Y, Sato H. Development of Acellular Pertussis Vaccines. *Biologicals*. 1999;27(2):61-69. doi:10.1006/BIOL.1999.0181
26. Fedele G, Bianco M, Ausiello CM. The Virulence Factors of *Bordetella pertussis*: Talented Modulators of Host Immune Response. *Arch Immunol Ther Exp* 2013 616. 2013;61(6):445-457. doi:10.1007/S00005-013-0242-1
27. Carbonetti NH, Artamonova G V., Mays RM, Worthington ZEV. Pertussis Toxin Plays an Early Role in Respiratory Tract Colonization by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 2003;71(11):6358-6366. doi:10.1128/IAI.71.11.6358-6366.2003/ASSET/9AF6FAE9-AF26-46A8-9475-24F3D26DE9A6/ASSETS/GRAPHIC/II1130888007.JPEG
28. Nasso M, Fedele G, Spensieri F, et al. Genetically Detoxified Pertussis Toxin Induces Th1/Th17 Immune Response through MAPKs and IL-10-Dependent Mechanisms. *J Immunol*. 2009;183(3):1892-1899. doi:10.4049/JIMMUNOL.0901071
29. Flak TA, Goldman WE. Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. *Cell Microbiol*. 1999;1(1):51-60. doi:10.1046/J.1462-5822.1999.00004.X
30. Ladant D, Ullmann A. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: A toxin with multiple talents. *Trends Microbiol*. 1999;7(4):172-176. doi:10.1016/S0966-

- 842X(99)01468-7
31. El-Azami-El-Idrissi M, Bauche C, Loucka J, et al. Interaction of Bordetella pertussis Adenylate Cyclase with CD11b/CD18. *J Biol Chem.* 2003;278(40):38514-38521. doi:10.1074/jbc.m304387200
 32. Hewlett EL, Donato GM, Gray MC. Macrophage cytotoxicity produced by adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis: more than just making cyclic AMP! *Mol Microbiol.* 2006;59(2):447-459. doi:10.1111/J.1365-2958.2005.04958.X
 33. Basler M, Masin J, Osicka R, Sebo P. Pore-forming and enzymatic activities of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin synergize in promoting lysis of monocytes. *Infect Immun.* 2006;74(4):2207-2214. doi:10.1128/IAI.74.4.2207-2214.2006/ASSET/9A166621-0B13-429C-BBE3-5DA07B7E7886/ASSETS/GRAPHIC/ZII0040658010005.JPEG
 34. Carbonetti NH, Artamonova G V., Andreasen C, Bushar N. Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin provide a one-two punch for establishment of Bordetella pertussis infection of the respiratory tract. *Infect Immun.* 2005;73(5):2698-2703. doi:10.1128/IAI.73.5.2698-2703.2005/ASSET/84D4EDA8-F743-4B3C-93E7-D728B3508FDC/ASSETS/GRAPHIC/ZII0050548020004.JPEG
 35. Melvin JA, Scheller E V., Noël CR, Cotter PA. New insight into filamentous hemagglutinin secretion reveals a role for full-length FhaB in Bordetella virulence. *MBio.* 2015;6(4). doi:10.1128/MBIO.01189-15/SUPPL_FILE/MBO004152427ST2.DOCX
 36. Serra DO, Conover MS, Arnal L, 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. *PLoS One.* 2011;6(12). doi:10.1371/journal.pone.0028811
 37. Inatsuka CS, Julio SM, Cotter PA. Bordetella filamentous hemagglutinin plays a critical role in immunomodulation, suggesting a mechanism for host specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(51):18578-18583. doi:10.1073/PNAS.0507910102/SUPPL_FILE/07910FIG7.PDF
 38. Leininger E, Roberts M, Kenimer JG, et al. Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing Bordetella pertussis surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1991;88(2):345-349. doi:10.1073/PNAS.88.2.345
 39. Inatsuka CS, Xu Q, Vujkovic-Cvijin I, et al. Pertactin is required for Bordetella species to resist neutrophil-mediated clearance. *Infect Immun.* 2010;78(7):2901-2909. doi:10.1128/IAI.00188-10/ASSET/94B9774D-4098-4989-8F14-0B4D67364BD1/ASSETS/GRAPHIC/ZII9990986790005.JPEG
 40. Stefanelli P, Fazio C, Fedele G, Spensieri F, Ausiello CM, Mastrantonio P. A natural pertactin deficient strain of Bordetella pertussis shows improved entry in human monocyte-derived dendritic cells. *New Microbiol.* 2009;32(2):159-166. Accessed December 17, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19579693/>
 41. Martin SW, Pawloski L, Williams M, et al. Pertactin-negative Bordetella pertussis strains: evidence for a possible selective advantage. *Clin Infect Dis.* 2015;60(2):223-227. doi:10.1093/CID/CIU788
 42. Zurita ME, Wilk MM, Carriquiriborde F, et al. A Pertussis Outer Membrane Vesicle-Based Vaccine Induces Lung-Resident Memory CD4 T Cells and Protection Against Bordetella pertussis, Including Pertactin Deficient Strains. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9(APR). doi:10.3389/FCIMB.2019.00125
 43. Safarchi A, Octavia S, Nikbin VS, et al. Genomic epidemiology of Iranian Bordetella pertussis: 50 years after the implementation of whole cell vaccine.

- Emerg Microbes Infect.* 2019;8(1):1416-1427. doi:10.1080/22221751.2019.1665479
44. Storsaeter J, Hallander HO, Gustafsson L, Olin P. Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine*. 1998;16(20):1907-1916. doi:10.1016/S0264-410X(98)00227-8
 45. Mattoo S, Miller JF, Cotter PA. Role of *Bordetella bronchiseptica* fimbriae in tracheal colonization and development of a humoral immune response. *Infect Immun*. 2000;68(4):2024-2033. doi:10.1128/IAI.68.4.2024-2033.2000
 46. Scheller E V., Cotter PA. *Bordetella* filamentous hemagglutinin and fimbriae: critical adhesins with unrealized vaccine potential. *Pathog Dis*. 2015;73(8):ftv079. doi:10.1093/FEMSPD/FTV079
 47. Holubova J, Stanek O, Juhasz A, Soumana IH, Makovicky P, Sebo P. The Fim and FhaB adhesins play a crucial role in nasal cavity infection and *Bordetella pertussis* transmission in a novel mouse catarrhal infection model. *PLoS Pathog*. 2022;18(4). doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1010402
 48. Harvill ET, Preston A, Cotter PA, Allen AG, Maskell DJ, Miller JF. Multiple roles for *Bordetella* lipopolysaccharide molecules during respiratory tract infection. *Infect Immun*. 2000;68(12):6720-6728. doi:10.1128/IAI.68.12.6720-6728.2000
 49. Gonyar LA, Gelbach PE, McDuffie DG, et al. In Vivo Gene Essentiality and Metabolism in *Bordetella pertussis*. *mSphere*. 2019;4(3). doi:10.1128/MSPHERE.00694-18
 50. Fedele G, Nasso M, Spensieri F, et al. Lipopolysaccharides from *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* differently modulate human dendritic cell functions resulting in divergent prevalence of Th17-polarized responses. *J Immunol*. 2008;181(1):208-216. doi:10.4049/JIMMUNOL.181.1.208
 51. Williams CL, Boucher PE, Stibitz S, Cotter PA. BvgA functions as both an activator and a repressor to control Bvg phase expression of *bipA* in *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol*. 2005;56(1):175-188. doi:10.1111/J.1365-2958.2004.04526.X
 52. Boulanger A, Chen Q, Hinton DM, Stibitz S. In vivo phosphorylation dynamics of the *Bordetella pertussis* virulence-controlling response regulator BvgA. *Mol Microbiol*. 2013;88(1):156-172. doi:10.1111/mmi.12177
 53. Moon K, Bonocora RP, Kim DD, et al. The BvgAS Regulon of *Bordetella pertussis*. *MBio*. 2017;8(5). doi:10.1128/MBIO.01526-17
 54. Martinez de Tejada G, Cotter PA, Heining U, et al. Neither the Bvg- phase nor the *vrg6* locus of *Bordetella pertussis* is required for respiratory infection in mice. *Infect Immun*. 1998;66(6):2762-2768. Accessed April 13, 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9596745>
 55. Merkel TJ, Stibitz S, Keith JM, Leef M, Shahin R. Contribution of Regulation by the *bvg* Locus to Respiratory Infection of Mice by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 1998;66(9):4367.
 56. Van Beek LF, De Gouw D, Eleveld MJ, et al. Adaptation of *Bordetella pertussis* to the Respiratory Tract. *J Infect Dis*. 2018;217(12):1987-1996. doi:10.1093/INFDIS/JIY125
 57. Medkova A, Siniashina LN, Rumiantseva IP, Voronina O, Kunda M, Karataev GI. [Accumulation of the *bvg*- *Bordetella pertussis* virulent mutants in the process of experimental whooping cough in mice]. *Mol Gen Mikrobiol Virusol*. Published online 2013.
 58. Farman MR, Petráčková D, Kumar D, et al. Avirulent Phenotype promotes *Bordetella pertussis* Adaptation to the Intramacrophage Environment.

- <https://doi.org/10.1080/2222175120222146536>. Published online November 10, 2022;1-96. doi:10.1080/22221751.2022.2146536
59. Chen Q, Stibitz S. The BvgASR virulence regulon of *Bordetella pertussis*. *Curr Opin Microbiol.* 2019;47:74-81. doi:10.1016/J.MIB.2019.01.002
 60. Merkel TJ, Boucher PE, Stibitz S, Grippe VK. Analysis of bvgR expression in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 2003;185(23):6902-6912. doi:10.1128/JB.185.23.6902-6912.2003
 61. Merkel TJ, Stibitz S. Identification of a locus required for the regulation of bvg-repressed genes in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 1995;177(10):2727-2736. doi:10.1128/jb.177.10.2727-2736.1995
 62. Coutte L, Huot L, Antoine R, et al. The multifaceted RisA regulon of *Bordetella pertussis*. *Sci Rep.* 2016;6:32774. doi:10.1038/srep32774
 63. Q C, V N, JM W, TJ M, S S. Activation of Bvg-Repressed Genes in *Bordetella pertussis* by RisA Requires Cross Talk from Noncooperonic Histidine Kinase RisK. *J Bacteriol.* 2017;199(22). doi:10.1128/JB.00475-17
 64. Jungnitz H, West NP, Walker MJ, Chhatwal GS, Guzmán CA. 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.* 1998;66(10):4640-4650. doi:10.1128/IAI.66.10.4640-4650.1998
 65. Stenson TH, Allen AG, Al-Meer JA, Maskell D, Pepler MS. *Bordetella pertussis* risA, but not risS, is required for maximal expression of Bvg-repressed genes. *Infect Immun.* 2005;73(9):5995-6004. doi:10.1128/IAI.73.9.5995-6004.2005
 66. Fedele G, Schiavoni I, Adkins I, Klimova N, Sebo P. Invasion of Dendritic Cells, Macrophages and Neutrophils by the *Bordetella* Adenylate Cyclase Toxin: A Subversive Move to Fool Host Immunity. *Toxins (Basel).* 2017;9(10). doi:10.3390/TOXINS9100293
 67. Mills KHG. Immunity to *Bordetella pertussis*. *Microbes Infect.* 2001;3(8):655-677. doi:10.1016/S1286-4579(01)01421-6
 68. Bassinet L, Gueirard P, Maitre B, Housset B, Gounon P, Guiso N. Role of adhesins and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 2000;68(4):1934-1941. doi:10.1128/IAI.68.4.1934-1941.2000
 69. Lamberti Y, Perez Vidakovics ML, van der Pol LW, Rodríguez ME. Cholesterol-rich domains are involved in *Bordetella pertussis* phagocytosis and intracellular survival in neutrophils. *Microb Pathog.* 2008;44(6):501-511. doi:10.1016/J.MICPATH.2008.01.002
 70. Lamberti YA, Hayes JA, Perez Vidakovics ML, Harvill ET, Rodriguez ME. Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect Immun.* 2010;78(3):907-913. doi:10.1128/IAI.01031-09
 71. Lamberti Y, Gorgojo J, Massillo C, Rodriguez ME. *Bordetella pertussis* entry into respiratory epithelial cells and intracellular survival. *Pathog Dis.* 2013;69(3):194-204. doi:10.1111/2049-632X.12072
 72. Rivera I, Linz B, Dewan KK, et al. Conservation of Ancient Genetic Pathways for Intracellular Persistence Among Animal Pathogenic *Bordetellae*. *Front Microbiol.* 2019;10. doi:10.3389/FMICB.2019.02839
 73. Ishibashi Y, Relman DA, Nishikawa A. Invasion of human respiratory epithelial cells by *Bordetella pertussis*: possible role for a filamentous hemagglutinin Arg-Gly-Asp sequence and alpha5beta1 integrin. *Microb Pathog.* 2001;30(5):279-288.

- doi:10.1006/MPAT.2001.0432
74. Schipper H, Krohne GF, Gross R. Epithelial cell invasion and survival of *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun*. 1994;62(7):3008-3011. doi:10.1128/IAI.62.7.3008-3011.1994
 75. Gueirard P, Bassinet L, Bonne I, Prevost MC, Guiso N. Ultrastructural analysis of the interactions between *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* and human tracheal epithelial cells. *Microb Pathog*. 2005;38(1):41-46. doi:10.1016/J.MICPATH.2004.08.003
 76. Paddock CD, Sanden GN, Cherry JD, et al. Pathology and pathogenesis of fatal *Bordetella pertussis* infection in infants. *Clin Infect Dis*. 2008;47(3):328-338. doi:10.1086/589753
 77. Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol*. 2003;57:677-701. doi:10.1146/ANNUREV.MICRO.57.030502.090720
 78. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science (80-)*. 1999;284(5418):1318-1322. doi:10.1126/science.284.5418.1318
 79. Donlan RM. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(9):881. doi:10.3201/EID0809.020063
 80. Serra D, Bosch A, Russo DM, et al. Continuous nondestructive monitoring of *Bordetella pertussis* biofilms by Fourier transform infrared spectroscopy and other corroborative techniques. *Anal Bioanal Chem*. 2007;387(5):1759-1767. doi:10.1007/s00216-006-1079-9
 81. Parise G, Mishra M, Itoh Y, Romeo T, Deora R. Role of a putative polysaccharide locus in *Bordetella* biofilm development. *J Bacteriol*. 2007;189(3):750-760. doi:10.1128/JB.00953-06
 82. Conover MS, Sloan GP, Love CF, Sukumar N, Deora R. The Bps polysaccharide of *Bordetella pertussis* promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin. *Mol Microbiol*. 2010;77(6):1439-1455. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07297.x
 83. Mishra M, Parise G, Jackson KD, Wozniak DJ, Deora R. The BvgAS Signal Transduction System Regulates Biofilm Development in *Bordetella*. *J Bacteriol*. 2005;187(4):1474. doi:10.1128/JB.187.4.1474-1484.2005
 84. Irie Y, Mattoo S, Yuk MH. The Bvg Virulence Control System Regulates Biofilm Formation in *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol*. 2004;186(17):5692-5698. doi:10.1128/JB.186.17.5692-5698.2004
 85. Sisti F, Ha D-G, O'Toole GA, Hozbor D, Fernandez J. Cyclic-di-GMP signalling regulates motility and biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiology*. 2013;159(Pt_5):869-879. doi:10.1099/mic.0.064345-0
 86. Serra DO, Lücking G, Weiland F, et al. Proteome approaches combined with Fourier transform infrared spectroscopy revealed a distinctive biofilm physiology in *Bordetella pertussis*. *Proteomics*. 2008;8(23-24):4995-5010. doi:10.1002/pmic.200800218
 87. Soane MC, Jackson A, Maskell D, et al. Interaction of *Bordetella pertussis* with human respiratory mucosa in vitro. *Respir Med*. 2000;94(8):791-799. doi:10.1053/RMED.2000.0823
 88. Cattelan N, Jennings-Gee J, Dubey P, Yantorno OM, Deora R. Hyperbiofilm Formation by *Bordetella pertussis* Strains Correlates with Enhanced Virulence Traits. *Infect Immun*. 2017;85(12). doi:10.1128/IAI.00373-17

89. Gutierrez M de la P, Wong TY, Damron FH, Fernández J, Sisti F. Cyclic di-GMP Regulates the Type III Secretion System and Virulence in *Bordetella bronchiseptica*. Brodsky IE, ed. *Infect Immun*. Published online May 25, 2022. doi:10.1128/IAI.00107-22
90. Belhart K, Gutierrez M de la P, Zacca F, et al. *Bordetella bronchiseptica* diguanylate cyclase BdcA regulates motility and is important for the establishment of respiratory infection in mice. *J Bacteriol*. Published online June 17, 2019. doi:10.1128/JB.00011-19
91. Ambrosis N, Boyd CDCDCD, O'Toole GAGAGA, Fernández J, Sisti F. Homologs of the LapD-LapG c-di-GMP effector system control biofilm formation by *Bordetella bronchiseptica*. *PLoS One*. 2016;11(7):e0158752. doi:10.1371/journal.pone.0158752
92. Ross P, Weinhouse H, Aloni Y, et al. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature*. 1987;325(6101):279-281. doi:10.1038/325279a0
93. Amikam D, Benziman M. Cyclic diguanylic acid and cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*. 1989;171(12):6649-6655. doi:10.1128/JB.171.12.6649-6655.1989
94. Galperin MY, Nikolskaya AN, Koonin E V. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol Lett*. 2001;203(1):11-21. Accessed September 14, 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11557134>
95. Petchiappan A, Naik SY, Chatterji D. Tracking the homeostasis of second messenger cyclic-di-GMP in bacteria. *Biophys Rev*. 2020;12(3):719-730. doi:10.1007/S12551-020-00636-1
96. Wang Z, Song L, Liu X, Shen X, Li X. Bacterial second messenger c-di-GMP: Emerging functions in stress resistance. *Microbiol Res*. 2023;268:127302. doi:10.1016/J.MICRES.2023.127302
97. Egli M, Gessner R V., Williams LD, et al. Atomic-resolution structure of the cellulose synthase regulator cyclic diguanylic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(8):3235-3239. doi:10.1073/PNAS.87.8.3235
98. Barends TRM, Hartmann E, Griese JJ, et al. Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Nature*. 2009;459(7249):1015-1018. doi:10.1038/NATURE07966
99. Minasov G, Padavattan S, Shuvalova L, et al. Crystal structures of Ykul and its complex with second messenger cyclic Di-GMP suggest catalytic mechanism of phosphodiester bond cleavage by EAL domains. *J Biol Chem*. 2009;284(19):13174-13184. doi:10.1074/JBC.M808221200
100. Krasteva P V., Jiunn JC, Shikuma NJ, et al. *Vibrio cholerae* vpst regulates matrix production and motility by directly sensing cyclic di-GMP. *Science (80-)*. 2010;327(5967):866-868. doi:10.1126/science.1181185
101. Gentner M, Allan MG, Zaehring F, Schirmer T, Grzesiek S. Oligomer formation of the bacterial second messenger c-di-GMP: reaction rates and equilibrium constants indicate a monomeric state at physiological concentrations. *J Am Chem Soc*. 2012;134(2):1019-1029. doi:10.1021/JA207742Q
102. Kim YK, McCarter LL. ScrG, a GGDEF-EAL protein, participates in regulating swarming and sticking in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol*. 2007;189(11):4094-4107. doi:10.1128/JB.01510-06
103. Bharati BK, Sharma IM, Kasetty S, Kumar M, Mukherjee R, Chatterji D. A full-length bifunctional protein involved in c-di-GMP turnover is required for long-term

- survival under nutrient starvation in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology*. 2012;158(Pt 6):1415-1427. doi:10.1099/MIC.0.053892-0
104. Ausmees N, Mayer R, Weinhouse H, et al. Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. *FEMS Microbiol Lett*. 2001;204(1):163-167. doi:10.1111/J.1574-6968.2001.TB10880.X
 105. Simm R, Morr M, Kader A, Nimtz M, Römling U. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol*. 2004;53(4):1123-1134. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04206.x
 106. Tischler AD, Camilli A. Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol Microbiol*. 2004;53(3):857-869. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04155.x
 107. Schirmer T. C-di-GMP Synthesis: Structural Aspects of Evolution, Catalysis and Regulation. *J Mol Biol*. 2016;428(19):3683-3701. doi:10.1016/j.jmb.2016.07.023
 108. Pallegar P, Peña-Castillo L, Langille E, Gomelsky M, Lang AS. Cyclic di-GMP-Mediated Regulation of Gene Transfer and Motility in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol*. 2020;202(2). doi:10.1128/JB.00554-19
 109. Christen B, Christen M, Paul R, et al. Allosteric control of cyclic di-GMP signaling. *J Biol Chem*. 2006;281(42):32015-32024. doi:10.1074/JBC.M603589200
 110. Dahlstrom KM, Giglio KM, Sondermann H, O'Toole GA. The Inhibitory Site of a Diguanylate Cyclase Is a Necessary Element for Interaction and Signaling with an Effector Protein. *J Bacteriol*. 2016;198(11):1595-1603. doi:10.1128/JB.00090-16
 111. Paul R, Abel S, Wassmann P, Beck A, Heerklotz H, Jenal U. Activation of the diguanylate cyclase PleD by phosphorylation-mediated dimerization. *J Biol Chem*. 2007;282(40):29170-29177. doi:10.1074/jbc.M704702200
 112. Zähringer F, Lacanna E, Jenal U, Schirmer T, Boehm A. Structure and signaling mechanism of a zinc-sensory diguanylate cyclase. *Structure*. 2013;21(7):1149-1157. doi:10.1016/J.STR.2013.04.026
 113. Whitney JC, Colvin KM, Marmont LS, Robinson H, Parsek MR, Howell PL. Structure of the cytoplasmic region of PelD, a degenerate diguanylate cyclase receptor that regulates exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*. 2012;287(28):23582-23593. doi:10.1074/JBC.M112.375378
 114. Gambari C, Boyeldieu A, Armitano J, Méjean V, Jourlin-Castelli C. Control of pellicle biogenesis involves the diguanylate cyclases PdgA and PdgB, the c-di-GMP binding protein MxdA and the chemotaxis response regulator CheY3 in *Shewanella oneidensis*. *Environ Microbiol*. 2019;21(1):81-97. doi:10.1111/1462-2920.14424
 115. Schmidt AJ, Ryjenkov DA, Gomelsky M. The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *J Bacteriol*. 2005;187(14):4774-4781. doi:10.1128/JB.187.14.4774-4781.2005
 116. Rao F, Yang Y, Qi Y, Liang ZX. Catalytic mechanism of cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase: A study of the EAL domain-containing RocR from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2008;190(10):3622-3631. doi:10.1128/JB.00165-08
 117. Tchigvintsev A, Xu X, Singer A, et al. Structural insight into the mechanism of c-di-GMP hydrolysis by EAL domain phosphodiesterases. *J Mol Biol*. 2010;402(3):524-538. doi:10.1016/j.jmb.2010.07.050
 118. Winkler A, Udvarhelyi A, Hartmann E, et al. Characterization of elements involved

- in allosteric light regulation of phosphodiesterase activity by comparison of different functional BlrP1 states. *J Mol Biol.* 2014;426(4):853-868. doi:10.1016/J.JMB.2013.11.018
119. Newell PD, Monds RD, Toole G a O. LapD is a bis-(3',5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *PNAS.* 2009;106(9).
120. Qi Y, Chuah MLC, Dong X, et al. Binding of cyclic diguanylate in the non-catalytic EAL domain of FimX induces a long-range conformational change. *J Biol Chem.* 2011;286(4):2910-2917. doi:10.1074/JBC.M110.196220
121. Galperin MY, Natale DA, Aravind L, Koonin E V. A specialized version of the HD hydrolase domain implicated in signal transduction. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 1999;1(2):303-305. Accessed December 20, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10943560/>
122. Sultan SZ, Pitzer JE, Boquoi T, Hobbs G, Miller MR, Motaleb MA. Analysis of the HD-GYP domain cyclic dimeric GMP phosphodiesterase reveals a role in motility and the enzootic life cycle of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun.* 2011;79(8):3273-3283. doi:10.1128/IAI.05153-11
123. Miner KD, Kurtz DM. Active Site Metal Occupancy and Cyclic Di-GMP Phosphodiesterase Activity of *Thermotoga maritima* HD-GYP. *Biochemistry.* 2016;55(6):970-979. doi:10.1021/ACS.BIOCHEM.5B01227
124. Römling U, Galperin MY, Gomelsky M. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2013;77(1):1-52. doi:10.1128/MMBR.00043-12
125. Seshasayee ASN, Fraser GM, Luscombe NM. Comparative genomics of cyclic-di-GMP signalling in bacteria: post-translational regulation and catalytic activity. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(18):5970-5981. doi:10.1093/NAR/GKQ382
126. Chen HJ, Li N, Luo Y, et al. The GDP-switched GAF domain of DcpA modulates the concerted synthesis/hydrolysis of c-di-GMP in *Mycobacterium smegmatis*. *Biochem J.* 2018;475(7):1295-1308. doi:10.1042/BCJ20180079
127. 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. *J Biol Chem.* 2005;280(35):30829-30837. doi:10.1074/jbc.M504429200
128. Navarro MVAS, De N, Bae N, Wang Q, Sondermann H. Structural analysis of the GGDEF-EAL domain-containing c-di-GMP receptor FimX. *Structure.* 2009;17(8):1104-1116. doi:10.1016/J.STR.2009.06.010
129. Jenal U. Cyclic di-guanosine-monophosphate comes of age: A novel secondary messenger involved in modulating cell surface structures in bacteria? *Curr Opin Microbiol.* 2004;7(2):185-191. doi:10.1016/j.mib.2004.02.007
130. Jenal U, Malone J. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu Rev Genet.* 2006;40:385-407. doi:10.1146/ANNUREV.GENET.40.110405.090423
131. Wassmann P, Chan C, Paul R, et al. Structure of BeF3⁻-modified response regulator PleD: implications for diguanylate cyclase activation, catalysis, and feedback inhibition. *Structure.* 2007;15(8):915-927. doi:10.1016/j.str.2007.06.016
132. De N, Navarro MVAS, Raghavan R V, Sondermann H. Determinants for the activation and autoinhibition of the diguanylate cyclase response regulator WspR. *J Mol Biol.* 2009;393(3):619-633. doi:10.1016/j.jmb.2009.08.030
133. Chen MW, Kotaka M, Vonnrhein C, et al. Structural insights into the regulatory mechanism of the response regulator RocR from *Pseudomonas aeruginosa* in

- cyclic Di-GMP signaling. *J Bacteriol.* 2012;194(18):4837-4846. doi:10.1128/JB.00560-12
134. Taylor BL, Zhulin IB. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999;63(2):479-506. doi:10.1128/MMBR.63.2.479-506.1999
135. Chang AL, Tuckerman JR, Gonzalez G, et al. Phosphodiesterase A1, a regulator of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*, is a heme-based sensor. *Biochemistry.* 2001;40(12):3420-3426. doi:10.1021/BI0100236
136. Delgado-Nixon VM, Gonzalez G, Gilles-Gonzalez MA. Dos, a heme-binding PAS protein from *Escherichia coli*, is a direct oxygen sensor. *Biochemistry.* 2000;39(10):2685-2691. doi:10.1021/BI991911S
137. Deng Y, Schmid N, Wang C, et al. Cis-2-dodecenoic acid receptor RpfR links quorum-sensing signal perception with regulation of virulence through cyclic dimeric guanosine monophosphate turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(38):15479-15484. doi:10.1073/PNAS.1205037109
138. Zhang Y, Guo J, Zhang N, Yuan W, Lin Z, Huang W. Characterization and analysis of a novel diguanylate cyclase PA0847 from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infect Drug Resist.* 2019;12:655-665. doi:10.2147/IDR.S194462
139. Hou S, Freitas T, Larsen RW, et al. Globin-coupled sensors: a class of heme-containing sensors in Archaea and Bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(16):9353-9358. doi:10.1073/PNAS.161185598
140. Wan X, Tuckerman JR, Saito JA, et al. Globins synthesize the second messenger bis-(3'-5')-cyclic diguanosine monophosphate in bacteria. *J Mol Biol.* 2009;388(2):262-270. doi:10.1016/j.jmb.2009.03.015
141. Burns JL, Rivera S, Deer DD, Joynt SC, Dvorak D, Weinert EE. Oxygen and Bis(3',5')-cyclic Dimeric Guanosine Monophosphate Binding Control Oligomerization State Equilibria of Diguanylate Cyclase-Containing Globin Coupled Sensors. *Biochemistry.* 2016;55(48):6642-6651. doi:10.1021/acs.biochem.6b00526
142. Wan X, Saito JA, Newhouse JS, Hou S, Alam M. The importance of conserved amino acids in heme-based globin-coupled diguanylate cyclases. *PLoS One.* 2017;12(8). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0182782
143. Rivera S, Young PG, Hoffer ED, et al. Structural Insights into Oxygen-Dependent Signal Transduction within Globin Coupled Sensors. *Inorg Chem.* 2018;57(22):14386-14395. doi:10.1021/ACS.INORGCHEM.8B02584
144. Martinez SE, Wu AY, Glavas NA, et al. The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(20):13260-13265. doi:10.1073/PNAS.192374899
145. Heikaus CC, Pandit J, Klevit RE. Cyclic nucleotide binding GAF domains from phosphodiesterases: structural and mechanistic insights. *Structure.* 2009;17(12):1551-1557. doi:10.1016/J.STR.2009.07.019
146. Anders K, Essen LO. The family of phytochrome-like photoreceptors: diverse, complex and multi-colored, but very useful. *Curr Opin Struct Biol.* 2015;35:7-16. doi:10.1016/J.SBI.2015.07.005
147. Kumar A, Toledo JC, Patel RP, Lancaster JR, Steyn AJC. Mycobacterium tuberculosis DosS is a redox sensor and DosT is a hypoxia sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(28):11568-11573. doi:10.1073/PNAS.0705054104/SUPPL_FILE/05054FIG11.PDF

148. Unden G, Nilkens S, Singenstreu M. Bacterial sensor kinases using Fe–S cluster binding PAS or GAF domains for O₂ sensing. *Dalt Trans.* 2013;42(9):3082-3087. doi:10.1039/C2DT32089D
149. Beavo JA, Brunton LL. Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(9):710-718. doi:10.1038/NRM911
150. Rybalkin SD, Rybalkina IG, Shimizu-Albergine M, Tang XB, Beavo JA. PDE5 is converted to an activated state upon cGMP binding to the GAF A domain. *EMBO J.* 2003;22(3):469-478. doi:10.1093/EMBOJ/CDG051
151. Martins TJ, Mumby MC, Beavo JA. Purification and characterization of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine tissues. *J Biol Chem.* 1982;257(4):1973-1979. doi:10.1016/S0021-9258(19)68134-2
152. Song J, Guo LW, Muradov H, Artemyev NO, Ruoho AE, Markley JL. Intrinsically disordered gamma-subunit of cGMP phosphodiesterase encodes functionally relevant transient secondary and tertiary structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(5):1505-1510. doi:10.1073/PNAS.0709558105
153. Muradov KG, Boyd KK, Martinez SE, Beavo JA, Artemyev NO. The GAFa domains of rod cGMP-phosphodiesterase 6 determine the selectivity of the enzyme dimerization. *J Biol Chem.* 2003;278(12):10594-10601. doi:10.1074/jbc.M208456200
154. Sardiwal S, Kendall SL, Movahedzadeh F, Rison SCG, Stoker NG, Djordjevic S. A GAF domain in the hypoxia/NO-inducible Mycobacterium tuberculosis DosS protein binds haem. *J Mol Biol.* 2005;353(5):929-936. doi:10.1016/J.JMB.2005.09.011
155. Xu HF, Dai GZ, Wang YJ, et al. Expansion of bilin-based red light sensors in the subaerial desert cyanobacterium *Nostoc flagelliforme*. *Environ Microbiol.* 2022;24(4):2047-2058. doi:10.1111/1462-2920.15932
156. Kanacher T, Schultz A, Linder JU, Schultz JE. A GAF-domain-regulated adenylyl cyclase from *Anabaena* is a self-activating cAMP switch. *EMBO J.* 2002;21(14):3672-3680. doi:10.1093/EMBOJ/CDF375
157. da Costa Vasconcelos FN, Maciel NK, Favaro DC, et al. Structural and Enzymatic Characterization of a cAMP-Dependent Diguanylate Cyclase from Pathogenic *Leptospira* Species. *J Mol Biol.* 2017;429(15):2337-2352. doi:10.1016/J.JMB.2017.06.002
158. Herbst S, Lorkowski M, Sarenko O, Nguyen TKL, Jaenicke T, Hengge R. Transmembrane redox control and proteolysis of PdeC, a novel type of c-di-GMP phosphodiesterase. *EMBO J.* 2018;37(8). doi:10.15252/embj.201797825
159. Giacalone D, Smith TJ, Collins AJ, Sondermann H, Koziol LJ, O'Toole GA. Ligand-Mediated Biofilm Formation via Enhanced Physical Interaction between a Diguanylate Cyclase and Its Receptor. *MBio.* 2018;9(4). doi:10.1128/MBIO.01254-18
160. Alm RA, Boder AJ, Free PD, Mattick JS. Identification of a novel gene, pilZ, essential for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 1996;178(1):46-53. doi:10.1128/JB.178.1.46-53.1996
161. Amikam D, Galperin MY. PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics.* 2006;22(1):3-6. doi:10.1093/bioinformatics/bti739
162. Ryjenkov DA, Simm R, Römling U, Gomelsky M. 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.* 2006;281(41):30310-30314. doi:10.1074/JBC.C600179200

163. Benach J, Swaminathan SS, Tamayo R, et al. The structural basis of cyclic diguanylate signal transduction by PilZ domains. *EMBO J.* 2007;26(24):5153-5166. doi:10.1038/SJ.EMBOJ.7601918
164. Cheang QW, Xin L, Chea RYF, Liang ZX. Emerging paradigms for PilZ domain-mediated C-di-GMP signaling. *Biochem Soc Trans.* 2019;47(1):381-388. doi:10.1042/BST20180543
165. Xu L, Venkataramani P, Ding Y, et al. A Cyclic di-GMP-binding Adaptor Protein Interacts with Histidine Kinase to Regulate Two-component Signaling. *J Biol Chem.* 2016;291(31):16112-16123. doi:10.1074/JBC.M116.730887
166. Paul K, Nieto V, Carlquist WC, Blair DF, Harshey RM. The c-di-GMP Binding Protein YcgR Controls Flagellar Motor Direction and Speed to Affect Chemotaxis by a “Backstop Brake” Mechanism. *Mol Cell.* 2010;38(1):128-139. doi:10.1016/j.molcel.2010.03.001
167. Wang F, He Q, Su K, et al. The PilZ domain of MrkH represents a novel DNA binding motif. *Protein Cell.* 2016;7(10):766-772. doi:10.1007/S13238-016-0317-Y
168. Li W, Li M, Hu L, et al. HpoR, a novel c-di-GMP effective transcription factor, links the second messenger’s regulatory function to the mycobacterial antioxidant defense. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(7):3595-3611. doi:10.1093/NAR/GKY146
169. Claudine B, Harwood CS. Cyclic diguanosine monophosphate represses bacterial flagella synthesis by interacting with the Walker A motif of the enhancer-binding protein FleQ. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(46):18478-18483. doi:10.1073/PNAS.1318972110
170. Sherwood A V., Henkin TM. Riboswitch-Mediated Gene Regulation: Novel RNA Architectures Dictate Gene Expression Responses. *Annu Rev Microbiol.* 2016;70:361-374. doi:10.1146/ANNUREV-MICRO-091014-104306
171. Tamayo R. Cyclic diguanylate riboswitches control bacterial pathogenesis mechanisms. *PLoS Pathog.* 2019;15(2). doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1007529
172. Petters T, Zhang X, Nesper J, et al. The orphan histidine protein kinase SgmT is a c-di-GMP receptor and regulates composition of the extracellular matrix together with the orphan DNA binding response regulator DigR in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol.* 2012;84(1):147-165. doi:10.1111/J.1365-2958.2012.08015.X
173. Newell PD, Yoshioka S, Hvorecny KL, Monds RD, O’Toole GA. Systematic analysis of diguanylate cyclases that promote biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *J Bacteriol.* 2011;193(18):4685-4698. doi:10.1128/JB.05483-11
174. Kazmierczak BI, Lebron MB, Murray TS. Analysis of FimX, a phosphodiesterase that governs twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* 2006;60(4):1026-1043. doi:10.1111/J.1365-2958.2006.05156.X
175. Valentini M, Filloux A. Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacteria. *J Biol Chem.* 2016;291(24):12547-12555. doi:10.1074/JBC.R115.711507
176. Sarenko O, Klauck G, Wilke FM, 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.* 2017;8(5). doi:10.1128/MBIO.01639-17
177. Richter AM, Possling A, Malysheva N, et al. Local c-di-GMP Signaling in the Control of Synthesis of the *E. coli* Biofilm Exopolysaccharide pEtN-Cellulose. *J Mol Biol.* 2020;432(16):4576. doi:10.1016/J.JMB.2020.06.006
178. Richter AM, Possling A, Malysheva N, et al. Local c-di-GMP Signaling in the Control of Synthesis of the *E. coli* Biofilm Exopolysaccharide pEtN-Cellulose. *J*

- Mol Biol.* 2020;432(16):4576-4595. doi:10.1016/J.JMB.2020.06.006
179. Brombacher E, Dorel C, Zehnder AJB, Landini P. The curli biosynthesis regulator CsgD co-ordinates the expression of both positive and negative determinants for biofilm formation in *Escherichia coli*. *Microbiology.* 2003;149(Pt 10):2847-2857. doi:10.1099/MIC.0.26306-0
 180. Dahlstrom KM, O'Toole GA. A Symphony of Cyclases: Specificity in Diguanylate Cyclase Signaling. *Annu Rev Microbiol.* 2017;71:179-195. doi:10.1146/ANNUREV-MICRO-090816-093325
 181. Dahlstrom KM, Collins AJ, Doing G, et al. A multimodal strategy used by a large c-di-GMP network. *J Bacteriol.* 2018;200(8). doi:10.1128/JB.00703-17
 182. Sommerfeldt N, Possling A, Becker G, Pesavento C, Tschowri N, Hengge R. Gene expression patterns and differential input into curli fimbriae regulation of all GGDEF/EAL domain proteins in *Escherichia coli*. *Microbiology.* 2009;155(Pt 4):1318-1331. doi:10.1099/MIC.0.024257-0
 183. Navarro MVAS, Newell PD, Krasteva P V., et al. Structural Basis for c-di-GMP-Mediated Inside-Out Signaling Controlling Periplasmic Proteolysis. *PLOS Biol.* 2011;9(2):e1000588. doi:10.1371/JOURNAL.PBIO.1000588
 184. Dahlstrom KM, Giglio KM, Collins AJ, Sondermann H, O'Toole GA. Contribution of physical interactions to signaling specificity between a diguanylate cyclase and its effector. *MBio.* 2015;6(6). doi:10.1128/mBio.01978-15
 185. Trimble MJ, McCarter LL. Bis-(3'-5')-cyclic dimeric GMP-linked quorum sensing controls swarming in *Vibrio parahaemolyticus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(44):18079-18084. doi:10.1073/PNAS.1113790108
 186. Bedrunka P, Graumann PL. Subcellular clustering of a putative c-di-GMP-dependent exopolysaccharide machinery affecting macro colony architecture in *Bacillus subtilis*. *Environ Microbiol Rep.* 2017;9(3):211-222. doi:10.1111/1758-2229.12496
 187. Sarenko O, Klauck G, Wilke F, et al. More than Enzymes That Make or Break Cyclic Di-GMP — Local Signaling in the Interactions of GGDEF/EAL Domain Protein of *Escherichia Coli*. *MBio.* 2017;8(5):e01639-17.
 188. Pultz IS, Christen M, Kulasekara HD, Kennard A, Kulasekara B, Miller SI. The response threshold of *Salmonella* PiiZ domain proteins is determined by their binding affinities for c-di-GMP. *Mol Microbiol.* 2012;86(6):1424-1440. doi:10.1111/MMI.12066
 189. Hiramatsu Y, Nishida T, Nugraha DK, et al. Interference of flagellar rotation up-regulates the expression of small RNA contributing to *Bordetella pertussis* infection. *Sci Adv.* 2022;8(51):eade8971. doi:10.1126/SCIADV.ADE8971
 190. Hiramatsu Y, Suzuki K, Motooka D, Nakamura S, Horiguchi Y. Expression of small RNAs of *Bordetella pertussis* colonizing murine tracheas. *Microbiol Immunol.* Published online March 30, 2020. doi:10.1111/1348-0421.12791
 191. Lamberti Y, Cafiero JH, Surmann K, et al. Proteome analysis of *Bordetella pertussis* isolated from human macrophages. *J Proteomics.* 2016;136:55-67. doi:10.1016/J.JPROT.2016.02.002
 192. Wong TY, Hall JM, Nowak ES, et al. Analysis of the In Vivo Transcriptome of *Bordetella pertussis* during Infection of Mice. *mSphere.* 2019;4(2). doi:10.1128/MSPHEREDIRECT.00154-19
 193. Zoraghi R, Corbin JD, Francis SH. Properties and Functions of GAF Domains in Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases and Other Proteins. *Mol Pharmacol.* 2004;65(2):267-278. doi:10.1124/mol.65.2.267

194. Hallgren J, Tsirigos KD, Damgaard Pedersen M, et al. DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. *bioRxiv*. Published online April 10, 2022:2022.04.08.487609. doi:10.1101/2022.04.08.487609
195. Schirmer T, Jenal U. Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(10):724-735. doi:10.1038/nrmicro2203
196. Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nat* 2021 5967873. 2021;596(7873):583-589. doi:10.1038/s41586-021-03819-2
197. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004;25(13):1605-1612. doi:10.1002/JCC.20084
198. Weigand MR, Peng Y, Loparev V, et al. The History of Bordetella pertussis Genome Evolution Includes Structural Rearrangement. *J Bacteriol*. 2017;199(8). doi:10.1128/JB.00806-16
199. Harvill ET, Goodfield LL, Ivanov Y, et al. Genome Sequences of 28 Bordetella pertussis U.S. Outbreak Strains Dating from 2010 to 2012. *Genome Announc*. 2013;1(6). doi:10.1128/GENOMEA.01075-13
200. Bart MJ, Harris SR, Advani A, et al. Global population structure and evolution of Bordetella pertussis and their relationship with vaccination. *MBio*. 2014;5(2). doi:10.1128/MBIO.01074-14
201. Chen Y, Liu S, Liu C, et al. Dcsbis (PA2771) from Pseudomonas aeruginosa is a highly active diguanylate cyclase with unique activity regulation. *Sci Rep*. 2016;6. doi:10.1038/SREP29499
202. Biswas S, Chouhan OP, Bandekar D. Diguanylate Cyclases in Vibrio cholerae: Essential Regulators of Lifestyle Switching. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10. doi:10.3389/FCIMB.2020.582947
203. Paul K, Nieto V, Carlquist WC, Blair DF, Harshey RM. The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a "backstop brake" mechanism. *Mol Cell*. 2010;38(1):128-139. doi:10.1016/J.MOLCEL.2010.03.001
204. Muriel C, Blanco-Romero E, Trampari E, et al. The diguanylate cyclase AdrA regulates flagellar biosynthesis in Pseudomonas fluorescens F113 through SadB. *Sci Rep*. 2019;9(1). doi:10.1038/S41598-019-44554-Z
205. Q C, S S. The BvgASR virulence regulon of Bordetella pertussis. *Curr Opin Microbiol*. 2019;47:74-81. doi:10.1016/J.MIB.2019.01.002
206. Menozzi FD, Boucher PE, Riveau G, Gantiez C, Locht C. Surface-associated filamentous hemagglutinin induces autoagglutination of Bordetella pertussis. *Infect Immun*. 1994;62(10):4261-4269. doi:10.1128/IAI.62.10.4261-4269.1994
207. Arnal L, Grunert T, Cattelan N, et al. Bordetella pertussis Isolates from Argentinean Whooping Cough Patients Display Enhanced Biofilm Formation Capacity Compared to Tohama I Reference Strain. *Front Microbiol*. 2015;6(DEC):1352. doi:10.3389/fmicb.2015.01352
208. Hoffman C, Eby J, Gray M, et al. Bordetella adenylate cyclase toxin interacts with filamentous haemagglutinin to inhibit biofilm formation in vitro. *Mol Microbiol*. 2017;103(2):214-228. doi:10.1111/MMI.13551
209. Levdivikov VM, Blagova E, Young VL, et al. Structure of the Branched-chain Amino Acid and GTP-sensing Global Regulator, CodY, from Bacillus subtilis. *J Biol Chem*. 2017;292(7):2714-2728. doi:10.1074/JBC.M116.754309

210. Bharati BK, Mukherjee R, Chatterji D. Substrate-induced domain movement in a bifunctional protein, DcpA, regulates cyclic di-GMP turnover: Functional implications of a highly conserved motif. *J Biol Chem.* 2018;293(36):14065-14079. doi:10.1074/JBC.RA118.003917
211. O'Shea EK, Klemm JD, Kim PS, Alber T. X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science.* 1991;254(5031):539-544. doi:10.1126/SCIENCE.1948029
212. Wolfgang MC, Lee VT, Gilmore ME, Lory S. Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway. *Dev Cell.* 2003;4(2):253-263. doi:10.1016/S1534-5807(03)00019-4
213. Inclan YF, Huseby MJ, Engel JN. FimL regulates cAMP synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One.* 2011;6(1). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0015867
214. Kulesekara H, Lee V, Brencic A, et al. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(8):2839-2844. doi:10.1073/PNAS.0511090103
215. Kim HK, Harshey RM. A Diguanylate Cyclase Acts as a Cell Division Inhibitor in a Two-Step Response to Reductive and Envelope Stresses. *MBio.* 2016;7(4). doi:10.1128/MBIO.00822-16
216. Jin Y, Zhang M, Zhu F, et al. NrtR Regulates the Type III Secretion System Through cAMP/Vfr Pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.* 2019;10(JAN). doi:10.3389/FMICB.2019.00085
217. Hengge R. High-specificity local and global c-di-GMP signaling. *Trends Microbiol.* 2021;29(11):993-1003. doi:10.1016/J.TIM.2021.02.003
218. Mantoni F, Rossi CS, Paiardini A, et al. Studying GGDEF Domain in the Act: Minimize Conformational Frustration to Prevent Artefacts. *Life (Basel, Switzerland).* 2021;11(1):1-13. doi:10.3390/LIFE11010031
219. Hengge R. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(4):263-273. doi:10.1038/NRMICRO2109
220. Merkel TJ, Barros C, Stibitz S. Characterization of the bvgR locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 1998;180(7):1682-1690. Accessed September 21, 2017. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9537363>
221. Cattelan N, Dubey P, Arnal L, Yantorno OM, Deora R. *Bordetella* biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. Carbonetti N, ed. *Pathog Dis.* 2016;74(1):ftv108. doi:10.1093/femspd/ftv108
222. Imlay JA. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem.* 2008;77:755-776. doi:10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.77.061606.161055
223. Li W, Hu L, Xie Z, et al. Cyclic di-GMP integrates functionally divergent transcription factors into a regulation pathway for antioxidant defense. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(14):7270-7283. doi:10.1093/nar/gky611
224. Stempel N, Nusser M, Neidig A, Brenner-Weiss G, Overhage J. The Oxidative Stress Agent Hypochlorite Stimulates c-di-GMP Synthesis and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.* 2017;8(NOV). doi:10.3389/FMICB.2017.02311
225. Schneider B, Gross R, Haas A. Phagosome acidification has opposite effects on intracellular survival of *Bordetella pertussis* and *B. bronchiseptica*. *Infect Immun.* 2000;68(12):7039-7048. doi:10.1128/IAI.68.12.7039-7048.2000

226. Cafiero JH, Lamberti YA, Surmann K, Vecerek B, Rodriguez ME. A Bordetella pertussis MgtC homolog plays a role in the intracellular survival. *PLoS One*. 2018;13(8). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0203204
227. Fernández J, Sisti F, Bottero D, Gaillard MEME, Hozbor D. Constitutive expression of bvgR-repressed factors is not detrimental to the Bordetella bronchiseptica-host interaction. *Res Microbiol*. 2005;156(8):843-850. doi:10.1016/j.resmic.2005.04.003
228. Fingerhann M, Hozbor D. Acid tolerance response of Bordetella bronchiseptica in avirulent phase. *Microbiol Res*. 2015;181:52-60. doi:10.1016/J.MICRES.2015.09.001
229. Westman J, Grinstein S. Determinants of Phagosomal pH During Host-Pathogen Interactions. *Front cell Dev Biol*. 2021;8. doi:10.3389/FCELL.2020.624958
230. Petráčková D, Farman MR, Amman F, et al. Transcriptional profiling of human macrophages during infection with Bordetella pertussis. *RNA Biol*. 2020;17(5):731-742. doi:10.1080/15476286.2020.1727694
231. Rao F, Qi Y, Chong HS, et al. The functional role of a conserved loop in EAL domain-based cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase. *J Bacteriol*. 2009;191(15):4722-4731. doi:10.1128/JB.00327-09
232. Nicholson TL, Conover MS, Deora R. Transcriptome profiling reveals stage-specific production and requirement of flagella during biofilm development in Bordetella bronchiseptica. *PLoS One*. 2012;7(11):e49166. doi:10.1371/journal.pone.0049166
233. Cummings CA, Bootsma HJ, Relman DA, Miller JF. Species- and strain-specific control of a complex, flexible regulon by Bordetella BvgAS. *J Bacteriol*. 2006;188(5):1775-1785. doi:10.1128/JB.188.5.1775-1785.2006
234. Luu LDW, Zhong L, Kaur S, Raftery MJ, Lan R. Comparative Phosphoproteomics of Classical Bordetellae Elucidates the Potential Role of Serine, Threonine and Tyrosine Phosphorylation in Bordetella Biology and Virulence. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11. doi:10.3389/FCIMB.2021.660280
235. Dworkin J. Ser/Thr phosphorylation as a regulatory mechanism in bacteria. *Curr Opin Microbiol*. 2015;24:47-52. doi:10.1016/J.MIB.2015.01.005
236. Egger LA, Inouye M. Purification and characterization of the periplasmic domain of EnvZ osmosensor in Escherichia coli. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;231(1):68-72. doi:10.1006/BBRC.1996.6007
237. MM B. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1-2):248-254. doi:10.1006/ABIO.1976.9999
238. Mettert EL, Kiley PJ. How Is Fe-S Cluster Formation Regulated? *Annu Rev Microbiol*. 2015;69(1):505. doi:10.1146/ANNUREV-MICRO-091014-104457
239. Singh VK, Singh K, Baum K. The Role of Methionine Sulfoxide Reductases in Oxidative Stress Tolerance and Virulence of Staphylococcus aureus and Other Bacteria. *Antioxidants*. 2018;7(10):128. doi:10.3390/ANTIOX7100128
240. Rivera-Millot A, Lesne E, Solans L, et al. Characterization of a Bvg-regulated fatty acid methyl-transferase in Bordetella pertussis. *PLoS One*. 2017;12(5):e0176396. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0176396
241. Page AL, Parsot C. Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. *Mol Microbiol*. 2002;46(1):1-11. doi:10.1046/J.1365-2958.2002.03138.X
242. Nogawa H, Kuwae A, Matsuzawa T, Abe A. The type III secreted protein BopD in Bordetella bronchiseptica is complexed with BopB for pore formation on the host

- plasma membrane. *J Bacteriol.* 2004;186(12):3806-3813. doi:10.1128/JB.186.12.3806-3813.2004
243. Hsieh YJ, Wanner BL. Global regulation by the seven-component Pi signaling system. *Curr Opin Microbiol.* 2010;13(2):198-203. doi:10.1016/J.MIB.2010.01.014
244. Pratt JT, Ismail AM, Camilli A. PhoB regulates both environmental and virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol.* 2010;77(6):1595-1605. doi:10.1111/J.1365-2958.2010.07310.X
245. Y X, W Z, M H, H N, W C, Q H. High c-di-GMP promotes expression of *fpr-1* and *katE* involved in oxidative stress resistance in *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019;103(21-22):9077-9089. doi:10.1007/S00253-019-10178-6
246. Hoffman CL, Gonyar LA, Zacca F, et al. *Bordetella pertussis* can be motile and express flagellum-like structures. *MBio.* 2019;10(3). doi:10.1128/mBio.00787-19
247. Li S, Sun H, Li J, et al. Autoinducer-2 and bile salts induce c-di-GMP synthesis to repress the T3SS via a T3SS chaperone. *Nat Commun.* 2022;13(1). doi:10.1038/S41467-022-34607-9
248. Hoffmann A, Thimm T, Dröge M, Moore ERB, Munch JC, Tebbe CC. Intergeneric Transfer of Conjugative and Mobilizable Plasmids Harbored by *Escherichia coli* in the Gut of the Soil Microarthropod *Folsomia candida* (Collembola). *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(7):2652. doi:10.1128/AEM.64.7.2652-2659.1998
249. Le Blay K, Gueirard P, Guiso N, Chaby R. Antigenic polymorphism of the lipopolysaccharides from human and animal isolates of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiology.* 1997;143 (Pt 4)(4):1433-1441. doi:10.1099/00221287-143-4-1433
250. Sisti F, Ha DG, O'Toole GA, Hozbor D, Fernández J. Cyclic-di-GMP signalling regulates motility and biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiology.* 2013;159(Pt 5):869-879. doi:10.1099/MIC.0.064345-0
251. He J, Baldini RL, Déziel E, et al. The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(8):2530-2535. doi:10.1073/PNAS.0304622101
252. Green MR, Sambrook J. Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with Sodium Dodecyl Sulfate: Minipreps. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016;2016(10):911-916. doi:10.1101/PDB.PROT093344
253. Boyle JS, Lew AM. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends Genet.* 1995;11(1):8. doi:10.1016/S0168-9525(00)88977-5
254. Lin Tung W, Chow KC. A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends Genet.* 1995;11(4):128-129. doi:10.1016/S0168-9525(00)89022-8
255. Shanks RMQ, Caiazza NC, Hinsa SM, Toutain CM, O'Toole GA. *Saccharomyces cerevisiae*-based molecular tool kit for manipulation of genes from gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(7):5027-5036. doi:10.1128/AEM.00682-06
256. Ambrosis N, Fernández J, Sisti F. Counter-Selection Method for Markerless Allelic Exchange in *Bordetella bronchiseptica* Based on *sacB* Gene From *Bacillus subtilis*. *Curr Protoc Microbiol.* 2020;59(1).
257. Link AJ, LaBaer J. In-Gel Trypsin Digest of Gel-Fractionated Proteins. *Cold Spring Harb Protoc.* 2009;2009(2):pdb.prot5110. doi:10.1101/PDB.PROT5110