



Universidad Nacional de Rosario
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas



Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos

Tesis de Doctorado

***“Estudios de los mecanismos de patogenicidad de bacterias
con diferentes estilos de vida”***

Adrián Ezequiel Golic

Directora
Dra. María Alejandra Mussi

Rosario, Argentina

2019

“Estudios de los mecanismos de patogenicidad de bacterias con diferentes estilos de vida”

Adrián Ezequiel Golic

Licenciado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CEFOBI), Departamento Química Biológica, Área Química Biológica, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 01/04/2014 y el 28/03/2019, bajo la dirección de la Dra. María Alejandra Mussi.

Nombres y firmas del Director y de los integrantes del Jurado de Tesis:

Directora:.....

Jurado:.....

Jurado:.....

Jurado:.....

Parte de los resultados obtenidos en la presente tesis se han dado a conocer en las siguientes publicaciones y presentaciones a congresos científicos:

Publicaciones:

C.E. Alvarez., F. Trajtenberg, N. Larrieux, M. Saigo, **A. Golic**, C. S. Andreo, S. A. Hogenhout, M. A. Mussi, M. F. Drincovich y A. Buschiazzi (2018). "The crystal structure of the malic enzyme from Candidatus Phytoplasma reveals the minimal structural determinants for a malic enzyme". *Acta Cryst. D74*, 332-340.

Abatedaga, I., Valle, L., **Golic, A.E.**, Müller, G.L., Cabruja, M., Morán Vieyra, F.E., Jaime, P.C., Mussi, M.A., Borsarelli, C.D. (2017). "Integration of Temperature and Blue-Light Sensing in *Acinetobacter baumannii* Through the BlsA Sensor." *Photochemistry and Photobiology*, 2017, 93: 805–814.

Ramírez M.S., Müller G.L., Pérez J.F., **Golic A.E.** y Mussi M.A. (2015). "More Than Just Light: Clinical Relevance of Light Perception in the Nosocomial Pathogen *Acinetobacter baumannii* and Other Members of the Genus *Acinetobacter*." *Photochemistry and Photobiology*, 2015, 91: 1291–1301.

Ramírez, M.S., Traglia, G.M., Pérez, J., Müller, G.L., Martínez, F., **Golic, A.E.**, y Mussi, M.A. (2015). White and blue light induce reduction in susceptibility to minocycline and tigecycline in *Acinetobacter* spp. and other bacteria of clinical importance. *J. Med Microbiol* 64, 525-37.

Saigo M., **Golic A.**, Alvarez C., Andreo C., Hogenhout S., Mussi M.A., Drincovich M.F. (2014). "Metabolic regulation of phytoplasma malic enzyme and phosphotransacetylase supports the use of malate as an energy source in these plant pathogens." *Microbiol.* 160: 2794–2806.

Congresos:

Golic A.E., Valle L., Müller G.L., Borsarelli C.D., Abatedaga I., Mussi M.A. "Insights into the mechanism of light and temperature perception through BlsA in *Acinetobacter baumannii*". Póster presentado en ELAFOT XIII Congreso Internacional de Fotoquímica y Fotobiología. Octubre 2017, Villa Carlos Paz, Córdoba.

Pérez J.F., Martínez F., Nguyen M., Müller G.L., **Golic A.E.**, Ramírez M.S., Mussi M.A. "La luz azul modula la susceptibilidad a los antibióticos minociclina y tigeciclina en

patógenos de relevancia clínica”. Póster presentado en ALAM-CAM XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología. XIV Congreso Argentino de Microbiología. Septiembre 2016, Rosario.

Saigo M., **Golic A.E.**, Alvarez C.E., MacLean A., Andreo C., Hogenhout S., Mussi M.A., Dricovich M.F. “Ácido málico: un punto de interés para la interacción entre el fitoplasma y su hospedador”. Trabajo presentado en el “Ciclo de divulgación de trabajos científicos 2015”. Desarrollado en la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Diciembre 2015, Rosario.

Müller G.L., **Golic A.E.**, Ramírez M.S., Mussi M.A. “Light modulates gene expression of components of the efflux pump AdelJK in *Acinetobacter baumannii*.” Póster presentado en el XI Congreso Argentino de Microbiología General – SAMIGE. Córdoba, Agosto de 2015.

Golic A., Martínez F., Jie Zhou, Sintim H., Mussi M.A. “Biofilm formation is inhibited by c-di-GMP in *Acinetobacter baumannii*.” Póster presentado en el 16° Congreso Internacional de Fotobiología, organizado por la Unión Internacional de Fotobiología (IUPB). Septiembre de 2014, Córdoba.

Saigo, M., **Golic, A.**, Alvarez, C.E., MacLean, A., Andreo, C., Hogenhout, S., Mussi, M.A., Drincovich, M.F. “Ácido málico: un punto de interés para la interacción entre el fitoplasma y su hospedador.” Póster presentado en la XV Reunión Argentina de Fisiología Vegetal (RAFV) organizado por la Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal (SAFV). Septiembre de 2014, Mar del Plata.

Agradecimientos

A Dios, por todo lo que fue, es y será.

A la Dra. Ma. Alejandra Mussi, por darme la oportunidad de sumarme a su proyecto y estar disponible para hacer las correcciones necesarias a la escritura de la tesis.

A los investigadores que integran al instituto, CEFOTI, por darme la posibilidad de desarrollarme dentro de sus instalaciones y especialmente a la Dra. Ma. Fabiana Drincovich, por ser un ejemplo de que la grandeza y el don de gente no son mutuamente excluyentes.

A los investigadores del subsuelo por estar siempre dispuestos a ayudar y despejar dudas: Marcos, Mariel, Dami, VCB, Claudia, MarianS, Clarisa y (especialmente) a la dupla Gabriela-Franco por ayudar tanto fuera del laboratorio.

A mis compañeros del subsuelo, los que estuvieron y los que están, por compartir buenos momentos y por hacer del día a día un clima más agradable para trabajar: Juan, MarianB, Paula, Cintia, Tatiana, Matias, Germán, Pablo, Romina, Agustina P, Gino, Marisel, Nery, Camila, Angie, Estefanía, Pitu, Laura M, Laura F, Mauro, Agustina T, Florencia.

A mis amigos de la vida, por proporcionar momentos de disfrute y distensión fuera de lo laboral: Leo, Manu, Uri, Diego, Ari, Lala, Dami, Fer, Alex.

A June, Iosef y especialmente a mi amigo y cuñado Jony por brindarse desinteresadamente.

A mis suegros y cuñados, por estar siempre al pie del cañón para ayudar en lo que haga falta.

A Natalia, Mariano, Tamara, Matías, Lucas y la Bobe por ser y estar y dar siempre una compañía indispensable para la vida y porque sin ellos, no sería quien soy ahora.

A Mamá y Papá, por ser el sostén de todo el camino recorrido y mucho más. Porque ahora puedo empezar a entender el valor y el esfuerzo de ser padre y dedicarse más a otro que a uno mismo... eterno agradecimiento.

A Iosef Eliezer y a Iehuda Mijael, por ser dos de los tres motivos por los que siempre prefiero estar en casa.

Si cada gota de agua fuera un "gracias", no alcanzarían los océanos para agradecerle a mi querida esposa, Brenda, por todo lo que hizo y hace por mí. Desde cambiar de estado civil, trabajo y ciudad de residencia (todo en el mismo momento), pasando por los dos hermosos hijos que me dio, por todo lo que me bancó durante el tiempo que duró el doctorado y la posibilidad o imposibilidad de viajar para pasar un finde con sus padres y hermana para evitar ciertos problemas, por preparar siempre las más exquisitas viandas para que me lleve al lab y durante este último tiempo de escritura de la tesis, por hacerse cargo 100% del mantenimiento de la casa, crianza de los mellis y de lo que yo pueda llegar a necesitar, siempre con buena onda y excelente predisposición.

Menciones especiales

Parte de los resultados obtenidos en el capítulo 4 han sido producto de una colaboración con el grupo del Dr. Claudio Borsarelli, del Instituto de Bionanotecnología del NOA (INBIONATEC), Universidad Nacional de Santiago del Estero (UNSE).

Parte de los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis, han sido producto de la colaboración de las Dras. Gabriela Müller, Clarisa Alvarez y Mariana Saigo del Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CEFOBI), Universidad Nacional de Rosario (UNR) y de la Bioquímica Jorgelina Perez del Laboratorio de Bacteriología Clínica. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Hospital Provincial del Centenario.

Índice

Resumen	1
Abstract.....	4
Abreviaturas y símbolos.....	7
1. Introducción general.....	10
1.1. Patogenicidad.	10
1.2. Acinetobacter baumannii.	11
1.2.1. Relevancia clínica.	11
1.2.2. Fotobiología	12
1.2.3. Dominios BLUF	12
1.2.4. Antecedentes de nuestro grupo.	13
1.3. Fitoplasma.....	14
1.3.1. Características generales.	14
1.3.2. Enfermedades y sintomatología.	15
1.3.3. Relación con los insectos vectores.	15
1.3.4. En las plantas.	16
1.3.5. Propagación.	16
1.3.6. Perspectivas para el control de enfermedades del fitoplasma.	17
2. Objetivos.	20
2.1. Objetivo general.....	20
2.2. Objetivos específicos.	20
2.2.1. Acinetobacter.....	20
2.2.2. Fitoplasma.....	20
3. Materiales y métodos.	22
3.1. Ensayos de motilidad.	22

3.1.1. Placas de motilidad.....	22
3.1.2. Placas de motilidad complementadas.....	22
3.2. Ensayos de formación de biofilms.....	23
3.2.1. Método de preparación de los ensayos.....	23
3.2.2. Medio complementado.....	23
3.2.3. Revelado.....	23
3.3. Condiciones lumínicas.....	23
3.4. Curvas de crecimiento.....	24
3.5. Reacción de transcripción reversa seguida de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-qPCR).....	24
3.5.1. Obtención de las muestras.....	24
3.5.1.1. Curvas de crecimiento.....	24
3.5.1.2. Cambio de condiciones del cultivo líquido.....	25
3.5.1.3. Motilidad.....	25
3.5.1.4. Susceptibilidad a MIN.....	25
3.5.1.5. Modulación de las bombas de eflujo independiente de BlsA.....	26
3.5.2. Extracción de ARN.....	26
3.5.3. Determinación de la cantidad y pureza del ARN.....	26
3.5.4. Determinación de la integridad del ARN.....	27
3.5.5. Eliminación del ADN genómico.....	27
3.5.6. Reacción de transcripción reversa.....	27
3.5.7. qPCR.....	28
3.5.8. Determinación de la expresión génica y análisis estadísticos.....	28
3.6. Inmunodetección.....	29
3.6.1. Obtención de las muestras.....	29
3.6.1.1. De placas de motilidad.....	29
3.6.1.2. De curva de crecimiento.....	29
3.6.1.3. Proteína recombinante control.....	29

3.6.2. Extracción de proteínas totales.	30
3.6.3. Cuantificación proteica.	30
3.6.4. Electroforésis.	30
3.6.5. Transferencia.	30
3.6.6. Inmunodetección	30
3.6.7. Revelado	31
3.6.7.1. kit femto.....	31
3.6.7.2. NBT y BCIP.....	31
3.6.8. Anticuerpos anti-BlsA	31
3.7. Medios de cultivo.....	32
3.7.1. Placas de LB-agar.	32
3.7.2. Ensayos de susceptibilidad a antibióticos.....	32
3.7.3 Citrato de Simmons.....	33
3.8. Cepas bacterianas, plásmidos y cebadores.	33
3.8.1. Cepas bacterianas, plásmidos y cebadores utilizados.	33
3.8.2. Cepas bacterianas generadas en el presente trabajo.	34
3.8.2.1. Bacterias electrocompetentes.	34
3.8.2.2. ATCC 19606 Δ blsA.	35
3.8.2.3. ATCC 17978 pWH1266-Pbof.	35
3.8.2.4. ATCC 17978 Δ blsA pWH1266-Pbof.	35
3.8.3. Plásmidos generados en el presente trabajo.	36
3.8.3.1. pWH1266-Pbof.....	36
3.8.4. Cebadores generados.	36
3.8.5. Conservación y utilización de ADN plasmídico.	36
3.8.5.1. Transformación química de E. coli DH5 α	36
3.8.5.2. Extracción de ADN plasmídico.	37
3.9. Análisis bioinformáticos.....	38
3.9.1. Construcción del árbol filogenético de dominios BLUF.....	38

3.9.2. Estudio bioinformático del contenido de DGCs y PDEs en <i>A. baumannii</i> .	38
3.9.3. Interacciones proteicas teóricas.	38
3.10. Medidas espectroscópicas.	38
3.10.1 Espectro de absorción.	38
3.10.2. Espectro de emisión de fluorescencia.	39
3.10.3. Espectro de Dicroísmo Circular.	39
3.11. Clonado, expresión y purificación de las proteínas EM y PduL.	40
3.11.1. Clonado.	40
3.11.2. Expresión.	40
3.11.3. Purificación.	41
3.11.4. Cristalización de la EM.	41
3.11.5. Procesamiento de datos de difracción, determinación de la estructura y procedimientos de refinamiento.	41
3.11.5. Análisis de secuencia y estructurales.	42
3.12. Ensayos de actividad enzimática.	42
3.12.1. Ensayos de actividad para la EM con NAD o NADP.	42
3.12.2. Ensayos de actividad para la PduL.	43
3.12.3. Ensayos de actividad para la EMY36A.	44
3.13. Cromatografías.	44
3.13.1. Cromatografía de exclusión molecular.	44
4. Integración de señales de luz y temperatura a través del fotorreceptor BlsA.	46
4.1. Introducción	46
4.2. Resultados y discusiones.	46
4.2.1. Determinación de la temperatura crítica de transición de la regulación por luz en <i>Acinetobacter</i> .	46
4.2.1.1. La modulación por luz de la motilidad de <i>A. baumannii</i> se da a temperaturas de 24° C o menores.	46

4.2.1.2. La expresión del gen <i>blsA</i> de <i>A. baumannii</i> está modulada por luz a temperaturas iguales o menores a 24° C.	48
4.2.1.3. Fotoquímica de <i>BlsA</i>	50
4.2.1.4. Discusión.	52
4.2.2. La dependencia de la fotorregulación de la motilidad con la temperatura es un proceso reversible.....	53
4.2.2.1. Reversibilidad de la regulación por luz de la motilidad de <i>A. baumannii</i> en función de la temperatura.	53
4.2.2.2. La capacidad de <i>BlsA</i> de realizar el fotociclo es reversible en función de la temperatura.	57
4.2.2.3. La modulación por luz de la motilidad es reversible a temperaturas cercanas a la crítica.....	59
4.2.2.4. Reversibilidad de la fotorregulación de la motilidad a 23° C.	61
4.2.2.5. Discusión.	63
4.2.3. La luz regula la motilidad asimismo en otras especies de <i>Acinetobacter</i> de interés clínico.	66
4.2.3.1 La regulación por luz de la motilidad se reduce gradualmente con la temperatura en <i>Acinetobacter</i> sp. A47.....	66
4.2.3.2. La regulación por luz de la motilidad se mantiene en un amplio rango de temperaturas en <i>A. nosocomialis</i> RUH2624.	68
4.2.3.3. Discusión.	69
4.2.4. Expresión génica de <i>blsA</i> en <i>A. baumannii</i>	69
4.2.4.1. La expresión de <i>blsA</i> aumenta en situación de hambre severo.	69
4.2.4.2. Los niveles del ARNm de <i>blsA</i> , disminuyen al pasar de 24°C a 37°C en un cultivo en oscuridad.....	73
4.2.4.3. Los niveles del ARNm de <i>blsA</i> disminuyen al pasar de oscuridad a luz azul en un cultivo a 24° C.	74
4.2.4.4. Discusión.	75
4.3. Conclusiones.	76
5. Transducción de la señal lumínica en <i>A. baumannii</i>	79
5.1. Introducción.....	79
5.2. Resultados y discusión.	81
5.2.1. Participación del c-di-GMP en la transducción de la señal lumínica en <i>A. baumannii</i>	81

5.2.1.1. Búsqueda in silico de DGCs y PDEs en el genoma de <i>A. baumannii</i> ATCC 17978.	81
5.2.1.2. El c-di-GMP no altera la modulación por luz de la motilidad en <i>A. baumannii</i>	82
5.2.1.3. El c-di-GMP modula la producción de biofilms en <i>A. baumannii</i>	84
5.2.1.4. Discusión.	85
5.2.2. Participación del producto del gen <i>bof</i> en la transducción de la señal lumínica. .	88
5.2.2.1. Análisis in silico del gen <i>bof</i> y el interactoma de la proteína BOF.	89
5.2.2.2. El producto del gen <i>bof</i> afecta a la motilidad de la mutante Δ blsA a 23° C y 37° C. ...	91
5.2.2.3. El producto del gen <i>bof</i> modifica la producción de biofilms en la cepa ATCC 17978 a 23° C y 37° C.	93
5.2.2.4. Discusión.	94
5.3. Conclusiones.	96
6. La susceptibilidad a ciertos antibióticos está regulada por luz en <i>A. baumannii</i>	99
6.1. Introducción.	99
6.2. Resultados y discusión.	101
6.2.1. La luz azul induce la expresión de genes de resistencia a TIG en <i>A. baumannii</i>	101
6.2.1.1. La luz azul induce la expresión de los genes de resistencia a TIG <i>adeABC</i>	101
6.2.1.2. La luz azul induce la expresión de los genes de la bomba <i>adeIJK</i>	104
6.2.1.3. Discusión.	107
6.2.2. La modulación de la susceptibilidad a MIN y TIG en <i>A. baumannii</i> no depende del fotorreceptor <i>BlsA</i>	108
6.2.2.1. Las cepas mutantes en el fotorreceptor <i>blsA</i> no ven alterada la susceptibilidad a MIN y TIG entre luz y oscuridad.	108
6.2.2.2. El $^1\text{O}_2$ gatilla la reducción en la susceptibilidad a MIN y TIG en <i>A. baumannii</i>	109
6.2.2.3. La presencia de $^1\text{O}_2$ induce la expresión de las bombas de eflujo <i>AdeABC</i> y <i>AdeIJK</i>	111
6.2.2.4. Discusión.	112
6.3. Conclusiones.	113
7. Utilización del malato como fuente de energía en ‘ <i>Candidatus Phytoplasma</i> ’ Aster Yellows Witches’-Broom.	115
7.1. Introducción.	115
7.2. Resultados y discusión.	117
7.2.1. Caracterización cinética y regulación metabólica de la EM-AYWB.	117

7.2.1.1. Caracterización cinética de la reacción catalizada por EM-AYWB en presencia de NAD.	117
7.2.1.2. Caracterización cinética de la EM-AYWB dependiente de NADP.	119
7.2.1.3. Regulación metabólica de la EM-AYWB dependiente de NAD/NADP.	121
7.2.1.4. Importancia del residuo Tirosina-36 en la catálisis de la EM-AYWB.	123
7.2.1.5. Discusión.	125
7.2.2. Caracterización cinética y regulación metabólica de la PduL de AYWB.	127
7.2.2.1. Caracterización cinética y regulación metabólica de la PduL de AYWB.	127
7.2.2.2. Discusión.	129
7.3. Conclusiones	129
8. Conclusiones generales.....	132
9. Bibliografía	136

Resumen

Resumen

Acinetobacter baumannii (*A. baumannii*) y 'Candidatus Phytoplasma' asteris (Fitoplasma) son dos patógenos con diferentes estilos de vida.

Por un lado, *A. baumannii* es un patógeno nosocomial oportunista capaz de generar infecciones en pacientes inmunodeprimidos y gravemente heridos, y está asociado a infecciones de alta mortalidad. Las cepas aisladas de infecciones son generalmente resistentes a múltiples antibióticos y capaces de persistir en condiciones de hambre severo y desecación. Se postula que dos de los mecanismos que esta bacteria utiliza como estrategia para la subsistencia son la motilidad y la capacidad de adherirse y formar biofilms sobre superficies bióticas y abióticas.

En el presente trabajo de tesis se estudió la capacidad de regulación de diversos aspectos fisiológicos y moleculares de *A. baumannii* en función de la luz y la temperatura, utilizando técnicas biofísicas, de biología molecular y microbiología.

Los resultados obtenidos indican que se detecta una temperatura crítica por debajo de la cual el fotorreceptor es funcional, por lo que habría dos niveles de control: la expresión del gen *bIsA* y la fotoquímica de BlsA en función de la luz y la temperatura. Además, se muestra que estos procesos son reversibles.

También se muestran resultados que indican que *A. nosocomialis* y *A. sp. A47* son capaces de regular la motilidad en función de la luz y esto tiene una dependencia de la temperatura diferente a *A. baumannii*, pudiendo modular la motilidad en función de la luz incluso a temperaturas compatibles con hospedadores de sangre caliente. Esta capacidad de modular la motilidad a temperaturas moderadamente altas podría deberse a una dotación desigual de genes homólogos a *bIsA*, cuyos productos génicos podrían tener estructuras que les permitan funcionar en otros rangos de temperaturas.

Mostramos que el mensajero secundario diguanilato cíclico (c-di-GMP) estaría involucrado en la transducción de la señal lumínica y que *A. baumannii* cuenta con 11 genes putativos que codificarían por diguanilato ciclasas (DGCs) y Fosfodiesterasas (PDEs), enzimas responsables de su síntesis y degradación.

Otro factor que participaría en la transducción de la luz es el producto del gen *bof*, el cual presenta un dominio de unión a oligonucleótido/oligosacárido. Este, actuaría como un regulador transcripcional de los genes involucrados en la formación de biofilms y su función dependería de BlsA. Por el contrario, el efecto del producto del gen *bof* en la motilidad sería a través de una molécula fotosensible distinta a BlsA y a temperaturas de 24° C y 37° C.

Finalmente, mostramos que la modulación por luz observada para la susceptibilidad a antibióticos en cepas clínicas de *A. baumannii* se correlaciona con la modulación de los niveles de expresión de genes que codifican por componentes de dos bombas de eflujo capaces de expulsar tigeciclina (TIG), como AdeABC y AdeIJK. Esta modulación no dependería de BlsA y cursaría por medio de la generación de $^1\text{O}_2$.

Por su parte, Fitoplasma es un patógeno de plantas que produce efectos devastadores en más de 700 cultivos de alto y bajo interés agronómico, incluyendo varios destinados a la alimentación. Es un microorganismo endosimbionte obligado que se transmite a través de insectos del orden Hemiptera, por lo que son capaces de vivir en asociación con dos hospedadores diferentes. Cuando un insecto portador de fitoplasma se alimenta de la planta inyectando su estilete, deposita a la bacteria en ese compartimiento, donde se desarrolla y disemina. Fitoplasma tiene un genoma muy reducido y carece de muchos genes que codifican por componentes de vías catabólicas, por lo que se cree que la utilización del malato, abundante en el floema, puede ser la clave para la obtención de energía y poder reductor a través de la vía del malato.

Utilizando técnicas bioquímicas y de biología molecular, en el presente trabajo de tesis se estudió la cinética de la enzima málica (EM) para comprobar su posible participación en la vía del malato y la regulación de su actividad por diversos metabolitos de dicha vía. Además, se evaluó la estructura cuaternaria y la importancia del residuo de Tirosina de la posición 36 que forma parte del sitio activo. También se evaluó la capacidad de la enzima PduL de participar en la vía del malato y la regulación de su actividad por diversos metabolitos de la vía.

Los resultados indicaron que tanto la EM como la PduL tienen la capacidad de participar en la vía del malato para la obtención de energía y poder reductor, que sus actividades están reguladas concertadamente por unos pocos metabolitos (Glutamina, Glutamato y acetil-fosfato) y especialmente por el nivel energético de la célula representado por la relación ATP/ADP. También se vio que el residuo Tyr36 es fundamental para la

actividad catalítica de la EM, pero no para la formación y mantenimiento de la estructura dimérica, la cual es especialmente interesante ya que este residuo en un sitio activo es aportado por un brazo proveniente del otro monómero.

En el presente trabajo de tesis se ha logrado ampliar el conocimiento de diversos aspectos de estos dos patógenos con diferentes estilos de vida. A partir de la información generada en este trabajo se pueden proponer diferentes blancos de acción para combatirlos de manera de controlarlos y evitar así las infecciones que pueden producir.

Abstract

Acinetobacter baumannii (*A. baumannii*) and 'Candidatus Phytoplasma' asteris (Phytoplasma) are two pathogens with different lifestyles.

On the one hand, the opportunistic nosocomial pathogen *A. baumannii* can cause infections in immunosuppressed and severely injured patients and is associated with high mortality infections. Isolated strains from infections are generally multidrug resistant and able to persist in starvation and desiccation conditions. It is postulated that motility and the ability to adhere and form biofilms on biotic and abiotic surfaces are two of the mechanisms that this bacterium uses as a subsistence strategy.

In this work, we studied the ability to regulate various physiological and molecular aspects of *A. baumannii* as a function of light and temperature using biophysical, molecular biology and microbiology techniques.

The results indicate that a critical temperature is detected below which the photoreceptor is functional, so there would be two levels of control: *blsA* gene expression and BlsA photochemistry as a function of light and temperature. In addition, these processes are shown to be reversible.

In addition, our results show that *A. nosocomialis* and *A. sp. A47* are capable of light regulating motility and this has a temperature dependence different from *A. baumannii*, being able to light modulate motility even at temperatures compatible with warm blood hosts. This ability to modulate motility at moderately high temperatures could be due to an unequal endowment of *blsA* homologous genes, whose protein structures may allow them to function in other temperature ranges.

We show that the secondary messenger c-di-GMP would be involved in the transduction pathway of the light signal and that *A. baumannii* has 11 putative genes coding for DGCs and PDEs, enzymes responsible for their synthesis and degradation.

Another factor that would participate in light transduction is the *bof* gene product, which presents an oligonucleotide/oligosaccharide binding domain. This would act as a transcriptional regulator of the genes involved in biofilms formation and its function would depend on BlsA. On the contrary, the effect of the *bof* gene product on motility would be

through a none-BlsA photosensitive molecule and at temperatures ranging from 24° C to 37° C.

Finally, we show that the light modulation observed for antibiotic susceptibility in *A. baumannii* isolates correlates with the modulation of gene expression levels coding for components of two efflux pumps capable of expelling TIG, such as AdeABC and AdeIJK. This modulation would not depend on BlsA and would be done through the generation of $^1\text{O}_2$.

On the other hand, Phytoplasma is a plant pathogen that produces devastating effects in more than 700 crops of high and low agronomic interest, including several destined to food. It is an obligated endosymbiotic microorganism that is transmitted through insects of the Hemiptera order, so they are able to live in association with two different hosts. When a phytoplasma-carrying insect feeds on the plant by injecting its stylet, it deposits the bacteria in that compartment, where it develops and disseminates. Phytoplasma has a very small genome and lacks many genes that encode by components of catabolic pathways, so it is believed that the use of malate, abundant in the phloem, may be the key to obtaining energy and reducing power through the malate pathway.

Using biochemical and molecular biology techniques, in the present thesis work, the kinetics of the malic enzyme (ME) was studied to verify its possible participation in the malate pathway and the regulation of its activity by different metabolites of this pathway. In addition, the quaternary structure and the importance of the Tyrosine 36 residue that is part of the active site were evaluated. The ability of PduL to participate in the malate pathway and the regulation of its activity by various metabolites in the pathway were also evaluated.

The results indicated that both ME and PduL are capable of participate in the malate pathway for obtaining energy and reducing power, that their activities are regulated by a few metabolites (Glutamine, Glutamate, and acetyl-phosphate) and especially by the cell energy level represented by the ATP/ADP ratio. It was also seen that the Tyr36 residue is fundamental for the catalytic activity of MS, but not for the formation and maintenance of the dimeric structure, which is especially interesting since this residue in an active site is contributed by an arm coming from the other monomer.

In this work, it has been possible to broaden the knowledge of diverse aspects of these two pathogens with different lifestyles. From the information generated in this work,

different action targets can be proposed to fight them in order to control them and thus avoid the infections they can produce.

Abreviaturas y símbolos

λ = Longitud de onda

Abs = absorbancia

ADN = ácido desoxirribo nucleico

ADNc = ADN copia

ARN = ácido ribonucleico

ARNm = ARN mensajero

AYWB = Aster Yellows Witches Broom

DEPC = pirocarbonato de di etilo

DO₆₀₀ = densidad óptica medida a 600 nm

EDTA = ácido etilen di-amino tetra acético

EM = Enzima mállica

hs = horas

M = concentración molar

MIN- minociclina

mM = concentración milimolar

NaAc = Acetato de sodio

nm = nanómetros

1O₂ oxígeno singulete

pb = pares de bases

PMSF = Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (inhibidor de proteasas)

PTA = Fosfo-trans-acetilasa

(p/v) = peso en volumen, gramos por cada 100ml de solución

rpm = revoluciones por minuto

SDS = dodecil sulfato de sodio

TET = tetraciclina

TIG = Tigeciclina

UA = Unidades de Absorbancia

Introducción general

1. Introducción general.

1.1. Patogenicidad.

Se define como patógeno al organismo que produce, o puede producir, enfermedad en un hospedador, el cual puede ser animal, planta o insecto [1].

La mayoría de las veces, los microorganismos potencialmente patógenos viven en asociación con los organismos hospedadores sin que aparentemente causen efecto alguno. Así, la enfermedad puede ser el resultado de un cambio repentino en el microorganismo, en el hospedador o en la relación entre ellos. Algunas enfermedades son el resultado de la reacción del organismo hospedador al patógeno y otras a toxinas producidas por ellos [144].

El resultado de la relación hospedador-patógeno depende de la virulencia de este último, esto es, de la capacidad del patógeno para causar daño al hospedador y de la resistencia o susceptibilidad del hospedador al patógeno [144].

De acuerdo a su estilo de vida, los patógenos han desarrollado ingeniosas estrategias que les permiten llevar adelante exitosos procesos de infección detectando y respondiendo a señales extracelulares que juegan un rol en las interacciones hospedador-patógeno y en su habilidad para persistir en el ambiente.

Ni la virulencia del patógeno ni la resistencia del hospedador son factores constantes: cada uno varía bajo la influencia de factores externos o como consecuencia de la propia relación hospedador-patógeno [144].

En el presente trabajo de tesis se propone ahondar en los mecanismos de patogenicidad de dos especies bacterianas con diferentes estilos de vida: *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) y '*Candidatus Phytoplasma*' asteris. Por un lado, ciertas cepas pertenecientes a la especie *A. baumannii* presentan un carácter de patógeno oportunista humano en el ámbito nosocomial, mientras que los fitoplasmas son bacterias fitopatógenas endosimbiontes obligados [144].

1.2. *Acinetobacter baumannii*.

1.2.1. Relevancia clínica.

Los miembros del género *Acinetobacter* son aerobios estrictos, coco bacilos Gram-negativos ubicuos que se encuentran frecuentemente en el medio ambiente y en establecimientos hospitalarios, donde algunos grupos particulares del género fueron asociados con brotes de infecciones nosocomiales [2].

A. baumannii es la especie clínica más importante del género. En las últimas décadas, surgió como uno de los patógenos oportunistas más comunes involucrados en infecciones adquiridas en hospitales, generalmente afectando a pacientes inmunodeprimidos y gravemente heridos [3]. *A. baumannii* se encuentra asociado a infecciones de alta mortalidad incluyendo septicemia, bacteriemia, neumonías, endocarditis, meningitis secundarias, infecciones de heridas y de tracto urinario [4], [5] y se ha identificado como el único agente causal de la fascitis necrotizante [6]. Las cepas de *A. baumannii* involucradas en los brotes de estas enfermedades son generalmente resistentes a múltiples drogas y fácilmente pueden colonizar ambientes nosocomiales y resistir a condiciones desfavorables tales como desecación, falta de nutrientes y tratamiento antimicrobiano. Estudios epidemiológicos han mostrado que *A. baumannii* puede persistir en la piel y mucosas humanas por días o semanas, permitiendo la colonización del personal hospitalario y la consecuente diseminación a los pacientes [4], [7]. Aun cuando exhibe escasa virulencia, su elevada resistencia intrínseca y su capacidad de adquirir rápidamente resistencia frente a nuevos fármacos [8] genera la selección y radicación de clones resistentes que dificultan el tratamiento de infecciones mediante el uso de terapias antimicrobianas rutinarias [9], [10]. Por todo esto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo ha declarado como una seria amenaza para la salud pública ubicándolo en el primer lugar entre los patógenos bacterianos de prioridad crítica que requieren atención urgente (World Health Organization 2017).

Se ha propuesto que un determinante clave para el éxito de este patógeno en establecimientos clínicos es la capacidad de adherirse a superficies bióticas y abióticas y formar biofilms en ellas [12]–[15]. A pesar de existir numerosos estudios sobre la resistencia a los antibióticos y la epidemiología de las infecciones por *A. baumannii*, poco se sabe sobre los factores ambientales y las señales que modulan su fisiología y habilidad para interactuar

con el ambiente médico y hospedador humano. Dentro de las señales ambientales detectadas por los organismos, la luz es aquella a la cual este trabajo se aboca particularmente. El rol de este estímulo ha sido ampliamente estudiado en organismos fotosintéticos, sin embargo, poco se sabe del rol que la luz cumple en la regulación de la fisiología de procariotas quimiótrofos no fotosintéticos, ya sean patógenos o ambientales.

1.2.2. Fotobiología

La superficie de nuestro planeta está sujeta a cambios dramáticos en los niveles de luz solar a lo largo del día. Además de ser una fuente primaria de energía para los organismos fotótrofos, la luz es una importante señal que muchos otros utilizan para evaluar el estado del ambiente. Así, especies de todos los reinos han desarrollado la capacidad de detectar y responder a las distintas longitudes de onda a través de todo el espectro visible [16]–[18].

Muchos microorganismos reaccionan de manera específica a la luz ambiental, ya sea migrando hacia un ambiente particular para aprovechar los efectos beneficiosos de la luz o lejos del mismo, para evadir los efectos perjudiciales de la radiación electromagnética, cambiando su comportamiento y/o metabolismo o induciendo funciones de reparación [19]. Estas respuestas se dan ya sea por modificación de la maquinaria existente o activación o represión de sets específicos de genes.

Las proteínas fotorreceptoras son las que median en primer lugar entre la señal dada por la luz ambiental y la respuesta biológica. Estas se definen como proteínas que no canalizan energía lumínica a los procesos bioenergéticos ni tienen funciones de reparación, sino que solamente generan una señal al ser excitadas por la luz.

La gran mayoría de los fotorreceptores descritos pueden ser clasificados en 6 familias bien definidas, principalmente basadas en la estructura de sus cromóforos. Estas son rodopsinas, fitocromos, xanthopsinas, criptocromos, fototropinas y las proteínas conteniendo dominios BLUF [17].

1.2.3. Dominios BLUF

La primer proteína caracterizada conteniendo dominio BLUF (Blue Light sensing Using FAD) fue AppA de *Rhodobacter sphaeroides*, la cual funciona como un anti-represor transcripcional de genes fotosintéticos [20]. Este dominio está ampliamente distribuido en proteínas de bacterias y eucariotas inferiores [21].

Basados en el análisis de la arquitectura del dominio, la familia de proteínas BLUF se clasifican en “cortas” o “complejas” [22]. Las proteínas cortas poseen, además del dominio BLUF, un segmento extra de aproximadamente 50 aminoácidos en su C-terminal que no posee homología con nada descrito, es decir, carecen de un dominio efector conocido. Se propone que éstas transducen la señal lumínica a un módulo efector asociado ubicado en otra cadena polipeptídica vía interacciones proteína-proteína [21]. En las proteínas complejas, tanto el dominio sensor como el efector residen en la misma cadena polipeptídica.

1.2.4. Antecedentes de nuestro grupo.

Trabajos anteriores de nuestro grupo han demostrado, utilizando herramientas genéticas y biofísicas, que tanto la motilidad, como la formación de biofilms y virulencia frente al eucariota *Candida albicans* son procesos regulados por luz en *A. baumannii*, y que dependen de una proteína fotorreceptora que contiene un dominio BLUF (*Blue light sensing using FAD*) N-terminal, a la que denominamos BlsA (*Blue light sensing A*) [12]. Específicamente, en este microorganismo la formación de biofilms se ve altamente inhibida en condiciones de luz, mientras que en oscuridad se produce esta estructura multicelular a 24° C [12]. Con respecto a la motilidad, en placas con medio semisólido ésta se ve inhibida en presencia de luz azul a 24° C, mientras que en oscuridad no se ve afectada y la bacteria se mueve por toda la superficie.

Esto es particularmente interesante ya que hasta entonces, la fotorregulación se estudió ampliamente en microorganismos fotótrofos, en los que la luz cumple además un rol en procesos bioenergéticos, mientras que en quimiótrofos no había sido prácticamente descrita.

Posteriormente, mostramos que la regulación por luz ocurre no sólo en *A. baumannii*, sino que se encuentra ampliamente distribuida dentro del género *Acinetobacter*, incluyendo otras especies de interés clínico [23].

La capacidad de *Acinetobacter baumannii* para formar biofilms en superficies bióticas y abióticas [13] y para moverse pueden ser factores claves en su patogenicidad, dado que esto contribuye a su persistencia y diseminación en los establecimientos nosocomiales, así como a la resistencia bacteriana a los compuestos antimicrobianos. Además de ser

características fisiológicas importantes, nos ofrecen modelos simples de estudio de la fotorregulación en las cepas salvajes y mutantes, como para poder profundizar en la caracterización del mecanismo de transducción de la señal lumínica.

1.3. Fitoplasma.

1.3.1. Características generales.

Los fitoplasmas (*'Candidatus Phytoplasma'*) son bacterias fitopatógenas que pertenecen a la clase Mollicutes, por lo que carecen de pared celular [24]–[26]. Son parásitos obligados que se transmiten por insectos del orden Hemiptera [27]. Sobreviven y se replican intracelularmente tanto en estos insectos como en las plantas que infectan mostrando de esta manera adaptación a la vida en dos hospedadores diferentes. Son inyectados en las plantas en el momento en que el insecto se alimenta y dentro de la planta se alojan en el floema [28], [29]. Son sumamente diversos y se clasifican filogenéticamente en 38 grupos y más de 200 subgrupos [30]. Son microorganismos pleomórficos, sin movilidad y con diámetros menores a 1 micrómetro. Al igual que otros miembros de la clase Mollicutes, que han surgido por evolución reductiva y sufrieron una extensa reducción de su genoma, las células de fitoplasma contienen un cromosoma de ADN de doble cadena circular con un tamaño de 600-800 kpb [25]. Su contenido es bajo en G+C (23%), una característica común a todos los miembros de la clase Mollicutes [29]. A pesar de sus genomas muy pequeños, muchos genes predichos están presentes en múltiples copias. Los genomas de fitoplasma contienen una gran cantidad de genes de transposición y secuencias de inserción que son exclusivas de estos organismos. Estos son los responsables de la variabilidad del genoma, permitiendo que los fitoplasmas sobrevivan en diversos ambientes de plantas e insectos y produciendo la marcada heterogeneidad de los tamaños del genoma del fitoplasma [31]–[33].

La extensa evolución reductiva resulta en capacidades metabólicas enormemente restringidas como consecuencia de su adaptación a la forma de vida en estrecha asociación con sus hospedadores eucariotas [34]. Por lo tanto, carecen de muchos genes para las funciones metabólicas estándar y no tienen vías de recombinación homólogas funcionales [31]. También carecen de genes para la biosíntesis de muchos componentes celulares fundamentales [35].

Se ha reportado que los fitoplasmas poseen una o dos proteínas de superficie con dominios transmembrana que le permiten adherirse a las células del hospedador (requisito previo para la colonización e infección) siendo claves para la interacción específica del fitoplasma con este [27].

Los fitoplasmas producen efectos devastadores en más de 700 especies de plantas [30], incluidos muchos cultivos de importancia económica, como los árboles frutales y las plantas ornamentales [36]. Pueden alterar la morfología de las plantas y la longevidad y tasas de reproducción y comportamiento de los insectos vectores [37].

1.3.2. Enfermedades y sintomatología.

Los fitoplasmas son responsables de enfermedades de las plantas que tienen un gran impacto económico [38]. Son capaces de infectar más de 700 especies de plantas [30] y de desarrollar más de 300 enfermedades distintas en ellas, afectando a cientos de géneros. Las enfermedades asociadas con los fitoplasmas ocurren en todo el mundo y en muchos cultivos, aunque los fitoplasmas individualmente pueden tener rangos de hospedadores limitados [27]. Los fitoplasmas están asociados con enfermedades de las plantas en varios cientos de especies, que incluyen cultivos muy importantes de vegetales, frutas, plantas ornamentales, madera y árboles de sombra. Muchas plantas cultivadas pueden ser infectadas por fitoplasma, tanto en países donde la agricultura no está avanzada como en países donde la agricultura está altamente industrializada [27].

Las plantas infectadas con fitoplasma muestran una amplia gama de síntomas, que incluyen retraso del crecimiento, coloración amarillenta, escoba de bruja (proliferación de brotes), filodía (formación de tejidos similares a hojas en lugar de flores), virescencia (reverdecimiento de los órganos florales), proliferación de brotes de órganos florales, enrojecimiento de las hojas y tallos y necrosis del floema [24].

1.3.3. Relación con los insectos vectores.

Los insectos responsables de la transmisión de fitoplasmas son principalmente los cicadelidos [26]. Una vez infectados, los insectos permanecen infecciosos por el resto de su vida, pero por lo general no transmiten los fitoplasmas a su progenie [39].

Algunos insectos huéspedes pueden beneficiarse de su asociación con los fitoplasmas, produciendo más descendencia, mostrando una mayor longevidad [40] y aumentando las distancias de vuelo [24]. Además, como consecuencia de los síntomas que el fitoplasma provoca en la planta, esta puede volverse más atractiva para los insectos vectores [24], ya que prefieren los tejidos vegetativos a los órganos reproductores [41].

1.3.4. En las plantas.

Los fitoplasmas son transferidos por los insectos a la planta, ingresando directamente al floema, desde donde se diseminan sistémicamente [27]. Son suficientemente pequeños para pasar libremente a través de los poros del tubo criboso, por lo que pueden ser arrastrados por el floema junto con los productos de asimilación del carbono desde las hojas a los órganos de las plantas que los consumen. En consecuencia, se han encontrado fitoplasmas en tejidos de raíz, como en hojas [42].

El movimiento activo de los fitoplasmas parece improbable, considerando la falta de genes que codifican los elementos del citoesqueleto o flagelos [38].

Los fitoplasmas dependen de la savia que alimenta a los insectos vectores para su transmisión [43].

Se cree que la transmisión de fitoplasmas a las semillas generalmente no es posible porque el floema carece de una conexión directa con la semilla [38].

1.3.5. Propagación.

La cepa *aster yellows witches broom* (AYWB) de fitoplasma suele infectar a las plantas anuales [44], que mueren al florecer y producir semillas, por lo que dependen de los insectos vectores para su propagación antes de que las plantas mueran [43]. Los fitoplasmas se propagan principalmente por insectos de la familia de los cicadelidos, que se alimentan de los tejidos del floema de las plantas infectadas [43]. El rango de huéspedes que puede infectar fitoplasma es, por lo tanto, fuertemente dependiente de los insectos vectores. Los fitoplasmas entran al insecto a través del estilete cuando este se alimenta del floema de las plantas infectadas. Luego se mueven a través del intestino y son absorbidos por la hemolinfa para finalmente colonizar las glándulas salivales. Todo este proceso puede durar hasta varias semanas y el tiempo que transcurre entre que el fitoplasma es absorbido por el

insecto y alcanza un título infeccioso en la glándula salival se define como su período latente [27].

Los fitoplasmas se mueven dentro de las plantas a través del floema desde el punto de ingreso hasta las raíces y pueden pasar a través de los elementos del tubo del criboso en el floema [42]. Varios estudios han mostrado una distribución desigual del fitoplasma en los órganos de las plantas hospedadoras y fluctuaciones estacionales en los hospedadores leñosos. En general, el título más alto se encontró en los órganos de origen (hojas maduras), mientras que el título más bajo se encontró en raíces [27]. Además, el título de fitoplasma varía mucho de una planta a otra, debido a las diferencias de las especies de plantas en su susceptibilidad a la infección por este fitopatógeno.

Los fitoplasmas tienen un efecto notable en las interacciones entre insectos y plantas, es decir, pueden hacer que las plantas infectadas sean más atractivas para los insectos. Estos vectores prefieren los tejidos verdes/amarillos jóvenes para la alimentación que justamente se producen en abundancia en plantas infectadas por fitoplasma, dando lugar a los síntomas llamados escoba de bruja, filodios, virescencia y coloración amarillenta [28].

Dado que los fitoplasmas son parásitos intracelulares de plantas e insectos [38], su capacidad para adaptarse a dos ambientes diversos es de considerable interés. Aproximadamente el 33% de los genes expresados cambia durante el pasaje entre la planta y el insecto, lo que sugiere que el fitoplasma altera dramáticamente la expresión del gen en respuesta a su huésped [45].

1.3.6. Perspectivas para el control de enfermedades del fitoplasma.

Los brotes de epidemias de enfermedades de fitoplasma pueden detenerse mediante el control de los vectores o eliminando a los patógenos de las plantas infectadas ya sea con antibióticos o con otros químicos [36].

La interferencia con la colonización de los insectos por los fitoplasmas, o con la absorción de nutrientes del fitoplasma en el floema vegetal, es el objetivo primario para la protección de las plantas sin usar pesticidas ni antibióticos.

Es importante identificar los factores involucrados en la patogenicidad de fitoplasmas para encontrar medidas efectivas de modo de controlar las enfermedades que causan. El

metabolismo energético es ciertamente un tema clave para comprender la biología del fitoplasma y su patogénesis.

Objetivos

2. Objetivos.

2.1. Objetivo general.

Estudiar diversos aspectos fisiológicos y/o bioquímicos de dos microorganismos patógenos que presentan estilos de vida diferente como *Acinetobacter baumannii* y *Candidatus Phytoplasma asteris*.

2.2. Objetivos específicos.

2.2.1. Acinetobacter.

Estudiar el comportamiento y la integración de las señales de luz y temperatura a través de BIsA y a nivel fotoquímico.

Caracterizar la dependencia de la temperatura de la fotorregulación de la motilidad en otras especies de importancia clínica del género *Acinetobacter*.

Identificar nuevos componentes involucrados en la transducción de la señal lumínica en *A. baumannii*.

Profundizar en el mecanismo de modulación de la susceptibilidad a antibióticos dependiente de la luz en *Acinetobacter*.

2.2.2. Fitoplasma.

Caracterizar la enzima málica predicha presentes en los genomas de los fitoplasmas "*Ca. Phytoplasma asteris*" cepa "Witches broom".

Evaluar la funcionalidad de la enzima PduL en la vía del malato en fitoplasmas.

Estudiar la regulación de la enzima málica y de la PduL por metabolitos de la vía del malato.

Materiales y métodos

3. Materiales y métodos.

3.1. Ensayos de motilidad.

3.1.1. Placas de motilidad.

Para ensayar la capacidad de fotorregulación de la motilidad de las diferentes cepas, se prepararon placas con medio semisólido “Swimming Agarose” (SA) conteniendo: 1% (p/v) triptona, 0,5% (p/v) NaCl y 0,3% (p/v) agarosa. Estas placas se prepararon en el momento de ser utilizadas, al igual que el medio, el cual se esterilizó en autoclave el mismo día y utilizó solo una vez. Las placas se prepararon con 20 ml de medio fundido, exactamente medido cada vez. Una vez solidificadas, se inocularon en el centro con la cepa correspondiente y se incubaron durante toda la noche en condiciones de luz azul o de oscuridad, según corresponda y a la temperatura indicada en cada caso, tras lo cual fueron inspeccionadas visualmente y comparadas. Todos los ensayos de motilidad se realizaron al menos 3 veces para cada cepa y condición de modo de tener 3 muestras biológicas independientes. Los valores obtenidos se analizaron mediante un análisis de la variancia (ANOVA) seguido del test de comparación múltiple de Tukey ($p < 0,05$) utilizando el programa SigmaPlot 12.0.

3.1.2. Placas de motilidad complementadas.

Para evaluar el efecto de los diferentes compuestos conteniendo el nucleótido guanina en la motilidad de las cepas ATCC 17978 y ATCC 17978 $\Delta bIsA$, estos se calentaron 15 minutos a 90° C con el fin de provocar el desagregado. Luego, se mezclaron con el medio semisólido SA fundido a una concentración final de 400 μM y se volcaron sobre la placa de Petri hasta que se solidificaron. Se utilizó esta concentración, ya que se reportó que a 400 μM el c-di-GMP produjo un 85% de inhibición de la formación de biofilms en *Staphylococcus aureus* DK825 [46]. Estas placas se prepararon en el momento de ser utilizadas, al igual que el medio, el cual se esterilizó en autoclave el mismo día y utilizó solo una vez. Las placas se prepararon con 20 ml de medio fundido, exactamente medido cada vez. Una vez solidificadas, se inocularon en el centro con la cepa correspondiente y se incubaron durante toda la noche en condiciones de luz azul o de oscuridad, según corresponda y a la temperatura indicada en cada caso, tras lo cual fueron inspeccionadas visualmente y comparadas. Todos los ensayos de motilidad se realizaron al menos 3 veces para cada cepa

y condición de modo de tener 3 muestras biológicas independientes. Los valores obtenidos se analizaron mediante un análisis de la variancia (ANOVA) seguido del test de comparación múltiple de Tukey ($p < 0,05$) utilizando el programa SigmaPlot 12.0.

Todos los compuestos de guanina utilizados fueron amablemente provistos por el Dr. Herman O. Sintim del Departamento de Biología Celular y Genética Molecular de la Universidad de Maryland, E.E.U.U.

3.2. Ensayos de formación de biofilms.

3.2.1. Método de preparación de los ensayos.

Para los ensayos de biofilms y tal como se describió en [12]; 0,01 ml de cultivo de la cepa correspondiente crecido durante toda la noche en agitación a 37° C se mezcló con 1 ml de medio de cultivo LB líquido, fresco y esterilizado en autoclave y esto luego se inoculó en tubos de vidrio durante 96 horas. Todos los ensayos se hicieron por triplicado para ambas condiciones, tanto de luz, como oscuridad y para cada cepa ensayada.

3.2.2. Medio complementado.

Para evaluar el efecto de los distintos compuestos conteniendo el nucleótido de guanina en la formación de biofilms de las cepas ATCC 17978 y ATCC 17978 $\Delta bIsA$, estos se calentaron 15 minutos a 90° C con el fin de provocar el desagregado. Luego, se mezclaron con el medio LB fresco a una concentración final de 400 μ M. Todos los ensayos se hicieron por triplicado para ambas condiciones de iluminación, para cada cepa ensayada y para cada compuesto utilizado.

3.2.3. Revelado.

Para el revelado de los ensayos de biofilms, el cultivo crecido se aspiró y el tubo se lavó vigorosamente con agua destilada. Las células adheridas a las paredes del tubo se visualizaron por tinción con violeta cristal 0,1 % (p/v).

3.3. Condiciones lumínicas.

Todos los ensayos realizados en condiciones de luz, esta fue emitida por arreglos de 9 LEDs (light-emitting-diode) con una intensidad de 6 a 10 μ mol fotones/m²s, la cual fue

determinada usando un luminómetro Li-250A (LI-COR). Cada arreglo se construyó usando tres tiras de LEDs (conteniendo tres LEDs cada una) con picos de emisión centrados a 462 nm en el caso de la luz azul, o a 700 nm en el caso de la luz roja, según lo determinado usando un espectralradiómetro LI-COR LI-1800 [12]. Cabe señalar que la temperatura de los medios líquidos y agar en las condiciones de iluminación usadas en estos experimentos no varía significativamente de aquella medida en condiciones de oscuridad o en la cámara de incubación.

3.4. Curvas de crecimiento.

Para las curvas de crecimiento realizadas se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) conteniendo: 1% (p/v) triptona; 0,5% (p/v) extracto de levadura; 1% (p/v) NaCl.

La cepa *A. baumannii* ATCC 17978 se dejó crecer durante toda la noche a 37° C con agitación a 200 rpm. A partir de este cultivo se hizo una dilución en medio LB fresco de modo de tener una DO₆₀₀ inicial de 0,1 UA al momento de dar inicio a la curva de crecimiento y en las condiciones indicadas en cada caso (24° C o 37° C y luz azul u oscuridad). Las curvas fueron monitoreadas midiendo la Abs a 600 nm (DO₆₀₀) de pequeñas alícuotas del cultivo en función del tiempo. Las curvas de crecimiento se realizaron al menos 3 veces para cada condición.

3.5. Reacción de transcripción reversa seguida de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-qPCR).

Con el fin de obtener información a nivel de transcripto para el ARNm de *blsA* en las diversas condiciones en estudio, se procedió a realizar experimentos de RT-qPCR.

3.5.1. Obtención de las muestras.

3.5.1.1. Curvas de crecimiento.

La cepa *A. baumannii* ATCC 17978 se dejó crecer durante toda la noche a 37° C con agitación a 200 rpm. A partir de este cultivo se hizo una dilución en medio LB fresco de modo de tener una DO₆₀₀ inicial de 0,1 al momento de dar inicio al experimento. A distintos tiempos que van de 0 min a 1800 min se tomaron muestras del cultivo, las cuales se

centrifugaron a 4° C, durante 15 min a 5000 rpm para recolectar las células. Luego se eliminó el sobrenadante y el *pellet* obtenido se congeló en N₂ líquido y se guardó a -80° C durante toda la noche. Este procedimiento se realizó por triplicado para obtener 3 muestras biológicas independientes para cada conjunto de condiciones y para cada alícuota analizada.

3.5.1.2. Cambio de condiciones del cultivo líquido.

La cepa *A. baumannii* ATCC 17978 se dejó crecer durante toda la noche a 37° C con agitación a 200 rpm. A partir de este cultivo se hizo una dilución en medio LB fresco de modo de tener una DO₆₀₀ inicial de 0,1 al momento de dar inicio al experimento. Una vez que este cultivo alcanzó una DO₆₀₀ = 0,5 se procedió a realizar el cambio de condiciones, pasándolo de 24° C a 37° C (en el caso del cultivo en oscuridad) o de condiciones de luz a oscuridad (en el caso del cultivo crecido a 23° C. Este momento se tomó como tiempo inicial (t₀), a partir del cual se tomaron muestras en los tiempos y condiciones indicados en cada caso. Las células recolectadas se centrifugaron a 4° C, durante 15 min a 5000 rpm para recolectar las células. Luego se eliminó el sobrenadante y el *pellet* obtenido se congeló en N₂ líquido y se guardó a -80° C durante toda la noche. Este procedimiento se realizó por triplicado para obtener 3 muestras biológicas independientes para cada conjunto de condiciones y para cada alícuota analizada.

3.5.1.3. Motilidad

Cada muestra de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 crecida en placas de motilidad en condiciones de luz y temperatura indicadas en cada caso, se cosecharon barriendo suavemente la superficie del medio con un bisturí y con una micropipeta, transfiriéndolas a un tubo eppendorf de 1,5ml. Se congelaron en N₂ líquido, se guardaron a -80° C durante toda la noche. Este procedimiento se realizó por triplicado para obtener 3 muestras biológicas independientes para cada conjunto de condiciones.

3.5.1.4. Susceptibilidad a MIN.

Las células de A42 o ATCC 19606 se crecieron a 24° C en microplacas de 96 pocillos en LB líquido hasta una DO₆₀₀ de 0,4 UA en luz azul o en oscuridad y en presencia o ausencia de una concentración final de 0,1 mg/ml de TIG . Las células se recolectaron, se centrifugaron,

se eliminó el sobrenadante, se congelaron con N₂ líquido y se guardaron a -80° C durante toda la noche. Este procedimiento se realizó al por triplicado para obtener 3 muestras biológicas independientes para cada condición analizada.

3.5.1.5. Modulación de las bombas de eflujo independiente de BlsA.

Las células de A42 se cosecharon barriendo suavemente con un bisturí la superficie de placas con LB-agar suplementadas o no con 5mM de azul de metileno (AM) e incubadas en luz roja o en oscuridad según se indica. El agregado de AM en conjunto con la luz roja promueve la generación de ¹O₂. Este ensayo se realizó por triplicado para cada condición analizada de modo de contar con 3 muestras biológicas independientes.

3.5.2. Extracción de ARN.

Las células se descongelaron lentamente, se resuspendieron en buffer de lisis (0,1 M NaAc; 10 mM EDTA; 1% SDS en agua tratada con DEPC) y se hirvieron durante 3 min. Luego se hicieron dos extracciones con fenol a pH4 (ajustado usando NaAc 50 mM) previamente calentado a 60° C y una extracción con cloroformo. En cada paso se incubó durante 2 min, se centrifugó 10 min a 12000 g y a 4° C y posteriormente se tomó la fase superior acuosa. El ARN obtenido de esta forma se precipitó durante toda la noche con etanol absoluto a -20° C, se lavó con etanol 70%, se resuspendió en H₂O destilada tratada con DEPC y se hidrató incubandolo 10 min a 55° C.

3.5.3. Determinación de la cantidad y pureza del ARN.

Para todos los casos, la cantidad y pureza del ARN extraído se determinaron espectrofotométricamente realizando diluciones 1:200 de las muestras de ARN en H₂O DEPC y se midieron las absorbancias a $\lambda = 260$ y 280 nm utilizando el programa KC Junior en un espectrofotómetro Power Wave XS (BIO-TEK Instruments) con paso óptico de 0,5 cm. Luego se estimó la pureza calculando la relación Abs₂₆₀/Abs₂₈₀. Valores entre 1,7 y 2,1 indican una pureza apropiada de la preparación de ARN total respecto al contenido de proteínas. Finalmente, se realizaron los cálculos necesarios para estimar la cantidad de ARN en cada muestra, considerando que 1 UA a $\lambda = 260$ nm corresponde a 40 μ g/ml de ARN simple hebra.

3.5.4. Determinación de la integridad del ARN.

Se determinó la integridad del ARN obtenido mediante electroforesis en geles de agarosa 1 % (p/v) en buffer de corrida TBE 0,5X (44 mM Tris-HCl pH = 8; 36 mM ácido bórico, 50 mM EDTA) en presencia de SyberSafe® a una concentración final de 0,5 µg/ml. Las muestras se mezclaron en relación 4:1 con buffer de siembra 5X (0,25 % (p/v) xilencianol; 0,25 % (p/v) azul de bromofenol; 30 % (v/v) glicerol). Se sembró adicionalmente el marcador de tamaño molecular ADN del fago λ (Thermo) digerido con *EcoRI* y *HindIII* (Promega), de concentración conocida. La corrida electroforética se realizó a una intensidad constante de 70 mA. Los geles fueron visualizados en transiluminador UV (longitud de onda de trabajo: 302 nm, equipo BioChemiSystem, UVP Bioimaging Systems) y fotografiados utilizando una cámara Hamamatsu 1394-C8484-51-03G.

3.5.5. Eliminación del ADN genómico.

4 µg de ARN total se trataron con 1 µl de DNAsa I (Promega); 0,25 µl de RNAsin (inhibidor de ARNasas, Promega) y H₂O DEPC hasta volumen final de 20 µl, por 30 min a 37 °C.

3.5.6. Reacción de transcripción reversa.

Las reacciones de transcripción reversa se realizaron con el fin de obtener la primera hebra de ADNc a partir del ARN total obtenido por extracción, para cada condición estudiada. 2µg de ARN total obtenido después de la eliminación del ADN genómico se mezclaron con 1 µl de oligonucleótidos al azar (Biodynamics) en un volumen final de 15 µl. Esta mezcla se incubó durante 5 minutos a 65° C y se llevó rápidamente a hielo, donde se agregaron 10 µl de buffer de reacción conteniendo 1 mM dNTPs (Thermo), buffer Mo-MLV 1X (Promega), 28 U RNAsin (inhibidor de ARNasas) y 200 U MoMLV (transcriptasa reversa, Promega) y H₂O DEPC hasta completar un volumen final de 25 µl. Esta preparación se incubó durante 2hs a 37° C y posteriormente la enzima Mo-MLV se inactivó incubando 10 min a 70° C.

Los productos de ADNc se diluyeron en una relación 1:8 para su posterior análisis mediante qPCR.

3.5.7. qPCR

El ADNc obtenido se amplificó con oligonucleótidos específicos para los genes de interés (listados en la Tabla 3.1) y *recA* (como gen normalizador).

Se incluyeron muestras de ARN sin retrotranscribir como control del contenido de ADN genómico. Las reacciones de RT-qPCR se desarrollaron en un termociclador con sistema de detección Mx3005P QPCR (Agilent technologies, Stratagene, programa MxPro QPCR versión 4.10) y utilizando el colorante fluorescente SyberGreen I (Invitrogen). El volumen final de 20 μ l contenía: buffer GoTaq 1X (Promega); 2,5 mM MgCl₂; 200 μ M dNTPs en mezcla equimolar; 0,5 mM de cada uno de los oligonucleótidos cebadores; 0,04 U/ μ l GoTaq ADN polimerasa (Promega); 1 μ l del ADNc correspondiente a cada muestra analizada o ARN sin retrotranscribir diluido en igual proporción a modo de control y H₂O destilada estéril hasta completar volumen final. Cada reacción de qPCR consistió en una desnaturalización inicial de 2 min a 94 °C, seguida de 40 ciclos de 4 etapas: 10 s a 96 °C (desnaturalización), 15 s a 54 °C (hibridación de cebadores), 1 min a 72 °C (elongación) y por último, se realizó una etapa de elongación final de 10 min a 72 °C.

Se determinaron las curvas de fusión para cada reacción de qPCR midiendo la disminución de fluorescencia de los productos obtenidos respecto al aumento de temperatura (de 65° C a 98 °C). La especificidad de las reacciones de PCR fue confirmada mediante el análisis de las curvas de fusión utilizando el software provisto por el equipo y, adicionalmente, mediante la verificación de tamaño de los productos de amplificación obtenidos en electroforesis en gel de agarosa 2 % (p/v) en SyberSafe.

3.5.8 Determinación de la expresión génica y análisis estadísticos.

La eficiencia de la amplificación para cada gen se determinó utilizando el método de la curva estándar relativa [47]. El cálculo de la expresión génica relativa al gen normalizador de cada transcripto se llevó a cabo mediante el método qBASE [48]. Para cada una de las 3 réplicas biológicas se realizaron 3 réplicas técnicas para el gen normalizador y para cada gen de interés. Los datos obtenidos se evaluaron a través de análisis de la variancia (ANOVA) seguido del test de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$) usando el programa SigmaPlot 12.0.

3.6. Inmunodetección.

Con el fin de obtener información a nivel de proteína para BlsA para cada condición en estudio, se procedió a realizar diversos experimentos de inmunodetección.

3.6.1. Obtención de las muestras

3.6.1.1. De placas de motilidad.

Para los ensayos de inmunodetección de la proteína BlsA de células de *A. baumannii* ATCC 17978 o de los controles ATCC 17978 Δ blsA y ATCC 17978 Δ blsA pWH1266-BlsA a partir de placas de motilidad, se cosecharon las bacterias en las condiciones de luz y temperatura correspondientes, barriéndolas suavemente con un bisturí por la superficie de la placa y se recolectaron con micropipeta en un tubo eppendorf de 1,5ml. Se centrifugaron 5 minutos a 5.000 rpm y se eliminó el sobrenadante. De esta manera se obtuvieron 3 muestras biológicas independientes para cada condición a partir de al menos 3 ensayos independientes.

3.6.1.2. De curva de crecimiento.

Para los ensayos de inmunodetección de la proteína BlsA de células de *A. baumannii* ATCC 17978 o de los controles ATCC 17978 Δ blsA, ATCC 17978 Δ blsA pWH1266 y ATCC 17978 Δ blsA pWH1266-BlsA proteínas provenientes de cultivos en LB líquido, se extrajeron las alícuotas correspondientes a los tiempos, condiciones de luz y temperatura indicados, se centrifugaron durante 5 minutos a 5.000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Esto se hizo al menos por triplicado para obtener 3 muestras biológicas independientes.

3.6.1.3. Proteína recombinante control.

La proteína BlsA unida a 6 residuos de His utilizada como control en los inmunoensayos se generó previamente por miembros de nuestro grupo, lo cual está reportado en el trabajo [12].

3.6.2. Extracción de proteínas totales.

Los pellets celulares obtenidos tal como se indicó en el punto anterior se resuspendieron en 5ml de TBS 1X (10 mM Tris-HCl pH=7,5; 150 mM NaCl) y con el inhibidor de proteasas PMSF a una concentración final de 0,2mM. Luego se sonicaron y se centrifugaron durante 20 minutos a 12.000rpm y a 4° C. Al sobrenadante se le agregó TCA a una concentración final de 10% para precipitar las proteínas totales y se incubó durante 30 minutos en hielo. Luego se centrifugó 15 minutos a 12.000rpm y a 4° C y se eliminó el sobrenadante. Se lavó con acetona fría 80% (v/v), se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente. El precipitado se resuspendió en SB 1x incoloro y se llevó a pH básico con una solución de Tris-HCl 1,5M; pH8,8 y se hirvieron durante 3 minutos.

3.6.3. Cuantificación proteica.

La concentración proteica total se realizó por el método de Bradford [49] utilizando el reactivo Protein Assay (Biorad) y albúmina sérica bovina como testigo.

3.6.4. Electroforésis.

Las proteínas totales de cada muestra se sembraron en cantidades iguales (350 µg) y se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) utilizando 15% de poliacrilamida.

3.6.5. Transferencia.

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron mediante la aplicación de un campo eléctrico desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-C, Amersham) utilizando una celda Trans-Blot SD Semi-Dry de Biorad durante 60 min a 20 V. La membrana luego se bloqueó por 1 h con 5 % (p/v) leche descremada en polvo en buffer TBS 1X (10 mM Tris-HCl pH=7,5, 150 mM NaCl).

3.6.6. Inmunodetección

La membrana de nitrocelulosa con las proteínas totales unidas se incubó durante toda la noche a 4° C con anticuerpo primario anti-BlsA en buffer TBS 1X en agitación suave. Luego

se hicieron 3 lavados de 15 minutos con TBS 1X y posteriormente incubó durante 1 hora en agitación suave con el anticuerpo secundario correspondiente y se repitieron los lavados.

3.6.7. Revelado

3.6.7.1. *kit femto.*

En este caso el anticuerpo secundario utilizado fue un anticuerpo IgG de conejo conjugado con la enzima peroxidasa de rabanito (HRP, BioRad) en TBS 1X (10 mM Tris-HCl pH=7,5; 150 mM NaCl).

Para el revelado se utilizó el kit SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo). La membrana se incubó durante 5 minutos con la solución de trabajo y se visualizó en el equipo BioChemiSystem, UVP Bioimaging Systems y se fotografió a distintos tiempos de exposición utilizando la cámara Hamamatsu 1394-C8484-51-03G.

3.6.7.2. *NBT y BCIP.*

En este caso el anticuerpo secundario utilizado fue un anticuerpo IgG de conejo conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (Sigma).

Posteriormente la membrana se reveló incubando con 20 µl de 50 mg/ml NBT y 10 µl 50 mg/ml de BCIP en 10 ml de buffer sustrato (100 mM Tris-HCl pH=9,5, 100 mM NaCl y 5 mM MgCl₂). La reacción se desarrolló en oscuridad hasta aparición de bandas púrpuras y se detuvo por lavados sucesivos con agua destilada. La membrana se secó a temperatura ambiente y se fotografió.

3.6.8. Anticuerpos anti-BlsA

El suero de conejo conteniendo los anticuerpos primarios anti-BlsA utilizados en los inmunoensayos se generaron por miembros de nuestro grupo de trabajo, lo cual está reportado en el trabajo [3].

Estos anticuerpos se purificaron incubando el suero con una membrana de nitrocelulosa sobre la que se había fijado previamente la proteína BlsA durante 1 hora con agitación suave. Luego se lavó la membrana 3 veces con TBS 1X (Tris-HCl 10mM, pH=7,5; NaCl 150mM) durante 15 minutos. Posteriormente se incubó la membrana durante 1 min

con solución de elución (Glicina 100mM, pH = 3, NaCl 100mM), se tomó la solución de elución y se neutralizó con 50 µl de una solución de neutralización (Tris-HCl 1M, pH=8).

3.7. Medios de cultivo

3.7.1. Placas de LB-agar.

Se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) conteniendo: 1% (p/v) triptona; 0,5% (p/v) extracto de levadura; 1% (p/v) NaCl complementado con 1,5% (p/v) para el crecimiento sistemático de las bacterias utilizadas en el presente trabajo de tesis. En ciertos casos se complementó con diferentes antibióticos para generar presión selectiva, dependiendo de la cepa cultivada.

3.7.2. Ensayos de susceptibilidad a antibióticos.

Estos ensayos se realizaron de acuerdo a los procedimientos recomendados por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2014) con algunas modificaciones.

Para la determinación de los halos de inhibición por antibiogramas se utilizaron placas de Petri con 20ml de LB-agar (Difco). Según el caso, las placas se suplementaron con azul de metileno (AM) para producir 1O_2 en presencia de luz roja (Galbis-Martínez et al. 2012). Las placas se inocularon con 100 µl de cultivo de cada cepa ensayada y previamente resuspendida en solución fisiológica y ajustada a una DO_{600} de 0,1. Estas células se inocularon en la superficie de la placa utilizando una espátula de Drigalsky para estandarizar las condiciones. Los discos con antibióticos (BBL) conteniendo 15 mg de TIG o 30 mg de MIN se ubicaron en la superficie de las placas, las cuales luego se incubaron durante toda la noche en condiciones de luz azul, roja u oscuridad, como se indica en cada caso. Todos los ensayos se hicieron como mínimo por triplicado. Los resultados se analizaron utilizando el programa SigmaPlot 12.0, mediante un análisis de la variancia (ANOVA) seguido de un test de comparación múltiples de Tukey ($p < 0,05$).

3.7.3 Citrato de Simmons.

Para los ensayos de conjugación se utilizaron placas con 20 ml de medio Citrato de Simmons (Britania) complementadas con 40mg/ml Kanamicina de modo de seleccionar las bacterias transconjugantes.

3.8. Cepas bacterianas, plásmidos y cebadores.

3.8.1. Cepas bacterianas, plásmidos y cebadores utilizados.

En el presente trabajo de tesis se utilizaron las cepas bacterianas, los plásmidos y los cebadores que se listan a continuación, en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Listado de Cepas bacterianas, plásmidos y cebadores utilizados en el presente trabajo de tesis, incluyendo características relevantes y el origen o referencia.

Cepa / plásmido / cebador	Características relevantes	Origen / Referencia
<i>A. baumannii</i>		
ATCC 17978	Aislamiento clínico	ATCC
ATCC 17978 pWH1266		[12]
ATCC 17978 pWH1266-Pbof		Este trabajo
ATCC 17978 ΔblsA		[12]
ATCC 17978 ΔblsA pWH1266		[12]
ATCC 17978 ΔblsA pWH1266-blsA		[12]
ATCC 17978 ΔblsA pWH1266-Pbof		Este trabajo
ATCC 19606		ATCC
ATCC 19606 ΔblsA		Este trabajo
<i>A. nosocomialis</i> RUH2624	Aislamiento clínico.	
A42	Aislamiento clínico.	[51]
A47	Aislamiento clínico.	[52], [53]2015, Traglia 2015
A118	Aislamiento clínico.	[54]
<i>Escherichia coli</i> DH5α		Gibco-BRL
<i>E. coli</i> DH5α pKnock-blsA::Kn	Bacteria dadora en conjugación.	[12]
<i>E. coli</i> HB101 pRK2073	Bacteria asistente en conjugación.	
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Bacteria para la expresión de proteína recombinante.	
Plásmidos		
pWH1266		[55]
pWH1266-Pbof		Este trabajo
pKnock-blsA::Kn		[12]
pGEM-T Easy	Plásmido de clonado.	Promega
pET28a	Plásmido de expresión.	

Cebadores	Secuencia	
recA.rtF	5'-TACAGAAAGCTGGTGCATGG-3'	[12]
recA.rtR	5'-TGCACCATTTGTGCCTGTAG-3'	[12]
PbofF	5'-GGATCCAGTCGACTCGAAGGAAG-3'	Este trabajo
PbofR	5'-GGATCCATTTATAAGCTTGCTTATT-3'	Este trabajo
adeA.rtF	5'-GGGCATGTATGTGCGTGTCAAT-3'	Este trabajo
adeA.rtR	5'-ACAACGACTCTGTCACCGACTT-3'	Este trabajo
adeB.rtF	5'-ATTGAGCGCGAATTATCGGGTG-3'	Este trabajo
adeB.rtR	5'-AAGCGAGCTTCTACAGCCTTGA-3'	Este trabajo
adeC.rtF	5'-ACAACCGTGATTACGGACTGC-3'	Este trabajo
adeC.rtR	5'-TAGGCAGTCATTCCAAGCAA-3'	Este trabajo
adel.rtF	5'-GGCAAGCTGTAGCGATGCTTGTTA-3'	Este trabajo
adel.rtR	5'-ATTGAGCCGTTTCGCAGCATT-3'	Este trabajo
adeJ.rtF	5'-CTTCCAGGTAGCGATTATTGCGGTT-3'	Este trabajo
adeJ.rtR	5'-ACACCAAAGCCTACAGAGTGCTGA-3'	Este trabajo
adeK.rtF	5'-GTCGGCGTTCGTAAGTTAATGA-3'	Este trabajo
adeK.rtR	5'-AGCTGCATATGAAGAACGCTGTGC-3'	Este trabajo
adeN.rtF	5'-CCAGTCTTGAGTCACATCATCTCGT-3'	Este trabajo
adeN.rtR	5'-ACGATGTCGTCAAGAGAGACAGCA-3'	Este trabajo
BlsA.R/1	5'-GCAATGTCTCACAATTATGT-3'	[12]
BlsA.F/2	5'-ATGACCATACAAACATCTAG-3'	[12]
PduLF	5'-GCTAGCATGGAGGAAAACATGTAT-3'	Este trabajo
PduLR	5'-CTCGAGTATTTTCAGTAATTTAAC-3'	Este trabajo
EMF	5'-GCTAGCATGAACATCAAAGAAAAAGCAT-3'	Este trabajo
EMR	5'-CTCGAGTCATTTTCTTACTACTCCAGT-3'	Este trabajo
EMY36AR	5'-GAGTGGCAACTAATGATAAATCATC-3'	Este trabajo

3.8.2. Cepas bacterianas generadas en el presente trabajo.

3.8.2.1. Bacterias electrocompetentes.

A partir de un cultivo crecido durante toda la noche y a 37° C de la cepa ATCC 17978 o ATCC 17978 Δ blsA se inoculó 1 litro de LB líquido previamente autoclavado y estéril, de modo de tener una DO₆₀₀ inicial de 0,1 UA. Posteriormente se incubó a 37° C en agitación (200rpm) hasta una DO₆₀₀ de 0,4 UA y se pasó a un baño de hielo durante 30 minutos. Posteriormente se dividió en recipientes adecuados para la centrifugación a 4000g durante 15 minutos a 4° C en una centrífuga de mesada Sorvall™. Luego se hicieron dos lavados con agua fría y estéril y un tercer lavado con glicerol 10% frío y estéril. Finalmente se

resuspendieron todas las células en 3 ml de glicerol 10% frío y estéril y se dividieron en tubos eppendorf de 1,5 ml, en alícuotas de 50 µl.

3.8.2.2. ATCC 19606 Δ blsA.

Se mezclaron las cepas E. coli DH5 α pKnock-blsA::Kn, E. coli HB101 pRK2073 y A. baumannii ATCC 19606 utilizándose como cepas dadora, asistente y receptora respectivamente en un ensayo de conjugación. Las transconjugantes se seleccionaron en placas de Petri conteniendo medio Citrato de Simmons (Britania) complementado con 40µg/ml kanamicina. El éxito del procedimiento se analizó mediante la extracción del ADN genómico de una transconjugante resistente a kanamicina y sensible a ampicilina, utilizándolo como molde para una reacción de PCR con oligos BlsA.F/2 y BlsA.R/1.

3.8.2.3. ATCC 17978 pWH1266-Pbof.

Se mezclaron 50 µl de las células ATCC 17978 electrocompetentes generadas en este trabajo con 2 µl del plásmido pWH1266-Pbof y se les aplicó un pulso de corriente con un equipo Generador de Pulso (código 1652076, BioRad) utilizando un potencial de 2V.

Posteriormente se adicionó 1 ml de LB líquido fresco y se incubaron durante 1 hora a 37° C para la recuperación. Luego, las bacterias transformantes se inocularon en placa de Petri con medio LB-agar conteniendo el antibiótico ampicilina en una concentración de 100 µg/ml de modo que solo puedan crecer las transformantes.

3.8.2.4. ATCC 17978 Δ blsA pWH1266-Pbof.

Se mezclaron 50 µl de las células ATCC 17978 Δ blsA electrocompetentes generadas en este trabajo con 2 µl del plásmido pWH1266-Pbof y se les aplicó un pulso de corriente con un equipo Generador de Pulso (código 1652076, BioRad) utilizando un potencial de 2V.

Posteriormente se adicionó 1 ml de LB líquido fresco y se incubaron durante 1 hora a 37° C para la recuperación. Luego, las bacterias transformantes se inocularon en placa de Petri con medio LB-agar conteniendo el antibiótico ampicilina en una concentración de 100 µg/ml de modo que solo puedan crecer las transformantes.

3.8.3. Plásmidos generados en el presente trabajo.

3.8.3.1. *pWH1266-Pbof*

Una región de ADN de 775 pares de bases (pb) incluyendo al gen *bof*, se clonó en el plásmido pWH1266 en el sitio de corte de la enzima BamHI, quedando bajo el control del promotor del propio gen. Para esto se utilizaron los cebadores PbofF y PbofR conteniendo en sus respectivos extremos 5' una secuencia para el reconocimiento de la enzima de restricción BamHI. Luego el producto de amplificación de la PCR se clonó en el sitio BamHI del plásmido pWH1266.

3.8.4. Cebadores generados.

Una lista con todos los cebadores utilizados, que incluye a los que se han generado en este trabajo de tesis se muestra en la tabla 3.1.

Todos los cebadores generados en este trabajo, se diseñaron con la ayuda del programa Primer3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), y sus propiedades se analizaron utilizando el programa Oligoanalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/site/account/login?returnurl=%2Fcalc%2Falyzer>) de modo de generar cebadores adecuados para el propósito requerido.

Aquellos cebadores diseñados especialmente para ensayos de qPCR se hicieron de modo que el producto generado sea de entre 150 pb y 300 pb.

3.8.5. Conservación y utilización de ADN plasmídico.

Todos los plásmidos utilizados en este trabajo se introdujeron en la cepa *E. coli* DH5 α para así guardarlos y conservarlos.

3.8.5.1. Transformación química de *E. coli* DH5 α .

A partir de un cultivo de *E. coli* DH5 α crecido con agitación a 200 rpm y a 37° C se hizo una dilución en medio LB líquido fresco de modo de tener una DO₆₀₀ inicial de 0,1 UA y se incubó nuevamente con agitación a 200 rpm y a 37° C. Una vez que se alcanzó una DO₆₀₀ de 0,4 UA se centrifugó una alícuota durante 3 minutos a 5.000 rpm y se eliminó el sobrenadante. El pellet de células se resuspendió en 500 μ l de CaCl₂ 0,1 M frío y estéril, se centrifugó, se resuspendió en 100 μ l de CaCl₂ 0,1 M frío y estéril y se agregó el plásmido correspondiente.

Posteriormente se incubó durante 1 hora en hielo, 1:30 minutos a 42° C y nuevamente 2 minutos en hielo. Se agregó 1 ml de LB líquido fresco y estéril y se incubó durante 1 hora a 37° C sin agitación. Luego, se centrifugó durante 3 minutos a 5.000 rpm, se eliminó el sobrenadante, excepto por un volumen de aproximadamente 100 µl y el pellet se resuspendió en ese volumen mencionado de sobrenadante. Esto se inoculó en placas de LB-agar conteniendo el antibiótico correspondiente para ejercer presión de selección y se esparció por todo el medio con espátula de Drigalsky. Las placas generadas de esta manera se incubaron durante toda la noche a 37° C y posteriormente se seleccionó una colonia para inocular LB líquido fresco complementado con el antibiótico correspondiente e incubarlo durante toda la noche a 37° C con agitación de 200 rpm. Una alícuota de este cultivo se guardó a -80° C en un criovial, con glicerol en una concentración final de 10%.

3.8.5.2. Extracción de ADN plasmídico.

La extracción de ADN plasmídico se llevó a cabo utilizando columnas QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN). A partir de un cultivo incubado durante toda la noche a 37° C, con agitación a 200 rpm, se tomó una alícuota de 3 ml y se centrifugó durante 3 minutos a 5000 rpm. El pellet se resuspendió en 100 µl de solución de lisis 1 (25 mM Tris-HCl pH=8; 10 mM EDT; 50 mM glucosa). Se agitó vigorosamente, incubó durante 5 minutos en un baño de hielo, se agregaron 200 µl de solución de lisis 2 (0,2 N NaOH; 1 % (p/v) SDS) y se mezcló suavemente por inversión. Luego se agregaron 150 µl de solución de lisis 3 (3 M KAc, 1,15 M HAc), se agitó vigorosamente, se incubó durante 5 minutos en hielo, se centrifugó durante 5 min a máxima velocidad y se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1,5 ml estéril conteniendo 500 µl de 6 M KI y 40 µl de 3 M NaAc pH=5,5. Luego, se transfirió todo el volumen a una columna QIAprep y se centrifugó durante 1 min a máxima velocidad. Se descartó el eluido y se lavó la columna con 750 µl de etanol al 80 % (v/v). Por último, se agregaron 50-100 µl de H₂O destilada y se centrifugó 1 minuto a máxima velocidad.

Finalmente, las extracciones fueron verificadas y la concentración de los plásmidos estimada por electroforesis en gel de agarosa 1-2 % (p/v) en presencia de SyberSafe.

3.9. Análisis bioinformáticos.

3.9.1. Construcción del árbol filogenético de dominios BLUF.

Con el objetivo de comparar los dominios BLUF de genes homólogos a *blsA* presentes en las especies nosocomiales *A. nosocomialis* RUH2624 y *A. sp.* A47 se realizó una búsqueda de secuencias utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y utilizando la secuencia de la región BLUF de *blsA* de *A. baumannii* ATCC 17978 como molde. Las secuencias se alinearon mediante MUSCLE [56] y se infirieron árboles filogenéticos mediante el método de máxima probabilidad (MEGA6; Tamura et al. 2013) basado en modelos de sustitución de aminoácidos particulares para cada grupo de secuencias (establecidos previamente a partir de análisis de los alineamientos). La significancia estadística de cada rama se evaluó por análisis de *bootstrap* con 500 repeticiones.

3.9.2. Estudio bioinformático del contenido de DGCs y PDEs en *A. baumannii*.

Utilizando la herramienta BLAST del NCBI se buscó la presencia de genes putativos que codifiquen por DGCs y PDEs en el genoma de *A. baumannii* ATCC 17978 utilizando la secuencia de la DGC PleD de *Caulobacter crescentus*. Las secuencias obtenidas se descargaron y se alinearon para su comparación y búsqueda de motivos conservados con el programa MegAlign (DNASTar, Lasergene).

3.9.3. Interacciones proteicas teóricas.

Para identificar las proteínas que se predice que pueden interactuar con el producto del gen *bof* y con *BlsA*, se utilizó la base de datos biológica STRING versión 11.0 (string-db.org).

3.10. Medidas espectroscópicas.

3.10.1 Espectro de absorción.

El espectro de absorción se registró utilizando un espectrofotómetro modular en miniatura UV-Vis USB2000+ (Ocean Optics, E.E.U.U), conectado a través de una fibra óptica a una fuente de luz UV-Vis (Analytical Instrument System, E.E.U.U). Los ensayos se

realizaron utilizando una cuveta de cuarzo de 5 x 5 milímetros (Hellma, Müllheim, Alemania) con 350 µl de BlsA fresca, montado en un porta cubetas FLASH 300 conectado a un controlador de temperatura basado en Peltier (Quantum Northwest). Los efectos de la dispersión de la luz en el espectro de absorción se corrigieron utilizando el programa a|e – UV-Vis-IR Spectral Software 1.2, FluorTools (www.fluortools.com) [58].

3.10.2. Espectro de emisión de fluorescencia.

El espectro de emisión de fluorescencia se registró con un espectrofluorómetro Hitachi F-2500 (Kyoto, Japón) equipado con un fotomultiplicador Hamamatsu R-928. Un filtro de densidad neutral de 10% T se ubicó en la salida del haz de excitación para minimizar los procesos fotoquímicos durante la adquisición. El espectro de emisión de BlsA se obtuvo mediante excitación selectiva del cofactor FAD a 450 nm. Todas las medidas se registraron entre 15,6° C y 36,6° C en una solución proteica saturada de aire.

Los tiempos de fluorescencia se registraron utilizando un sistema contador de fotones Tempro-01 time-correlated single photon counting (TCSPC) (Horiba, Glasgow, Reino Unido). El decaimiento de la intensidad de fluorescencia obtenido por excitación con un pulso de luz azul (Nanoled® 461 ± 27 nm, 1 MHz, Horiba) se ajustó con el programa de análisis de decaimiento de la fluorescencia DAS6® (Horiba) por deconvolución de la función de pulso (obtenido con una suspensión Ludox® diluída a la longitud de onda de excitación) usando una función de modelo multiexponencial. El control de temperatura para los experimentos se realizó utilizando un baño con fluído circulatorio (Haake F3) conectado al soporte de la cubeta. Todos los experimentos se realizaron por duplicado y se reportan los promedios con su desvío estándar [58].

3.10.3. Espectro de Dicroísmo Circular.

El espectro de Dicroísmo Circular se obtuvo utilizando un espectropolarímetro Jasco J-810 utilizando celdas con un paso óptico de 0,5 cm y 0,2 cm y promediando 8 escaneos repetitivos entre 200nm y 250nm a 30° C. Para cada ensayo se utilizaron aproximadamente 50mg de cada proteína en buffer fosfato (20 mM Na₂HPO₄ pH 8,0; 5 mM MgCl₂).

3.11. Clonado, expresión y purificación de las proteínas EM y PduL.

3.11.1. Clonado.

Los marcos abiertos de lectura de la EM y PduL de fitoplasma AYWB se amplificaron por PCR utilizando como molde ADN total de plantas de lechuga infectadas con 'Ca. Phytoplasma' AYWB utilizando los cebadores PduLF, PduLR, EMF, EMR indicados en la tabla 3.1. Estos cebadores se diseñaron de modo que el producto de amplificación de cada par tenga un extremo que pueda ser cortado por la enzima de restricción NheI y el otro extremo por XhoI. Estos productos de amplificación se clonaron en el vector pGEM T-Easy (Promega) y luego se subclonaron en el plásmido de expresión pET28a (Novagen) utilizando las enzimas de restricción mencionadas. Los productos de expresión se diseñaron de modo de tener un extremo N-terminal de 6 residuos de His para su purificación en una columna de Ni-agarosa.

Por otro lado, se realizó una mutagenesis sitio-dirigida mediante un MegaPrimer amplificado por PCR utilizando los cebadores EMF y EMY36AR. El MegaPrimer luego se usó con el cebador EMR para obtener la secuencia mutada (EM-Tyr36Ala). Los productos de amplificación se clonaron en el vector pGEM T-Easy (Promega) y el fragmento cortado con las enzimas de restricción NheI y XhoI se subclonó en los sitios del pET28a (Novagen). El producto de expresión se diseñó de modo de tener un extremo N-terminal de 6 residuos de His para su purificación en una columna de Ni-agarosa.

3.11.2. Expresión.

Para la expresión se transformaron células de *E. coli* BL21(DE3) con los plásmidos pET28a-EM, pET28a-PduL o pET28a-EMY36A. Se crecieron hasta una DO600 de 0,4-0,8 en medio LB con kanamicina. Los cultivos se indujeron mediante el agregado de IPTG 0,1mM. Después de 12-16 horas de crecimiento aeróbico a 16° C las células se recolectaron por centrifugación durante 5 minutos a 4000g y se resuspendieron en buffer A (100 mM Tris-HCl; pH 8; 10 mM MgCl₂, 2 mM PMSF, 5 mg/ml DNasa I). Posteriormente se sonicaron y el lisado obtenido se centrifugó durante 20 minutos a 15000g a 4° C y el sobrenadante se mezcló con buffer de unión 1X (5 mM imidazol; 500 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 7,9) suplementado con glicerol 10% (v/v).

3.11.3. Purificación.

El sobrenadante se cargó en columnas con 5ml de resina Ni-NTA (Qiagen) previamente equilibradas con buffer de unión. Después de lavarse con buffer de unión y con buffer de lavado (49 mM imidazol; 500 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 7,9) las proteínas se eluyeron con buffer de elución (200 mM imidazol; 500 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 7,9). Las proteínas EM, PduL y EMY36A marcadas con las 6His se concentraron utilizando concentradores (Amicon Ultra-15, Millipore) y se desalaron utilizando buffer B [100 mM Tris-HCl; pH 7,5; glicerol 10 % (v/v)] y luego se digirieron en una mezcla con trombina en relación 20:1 en buffer B suplementado con 1 mM MgCl₂ a 16° C durante 2 horas para remover el extremo N-terminal de 6His. Las proteínas purificadas se guardaron a -80° C hasta que se caracterizaron. Las concentraciones se determinaron espectrofotométricamente a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción teórico de cada proteína: EM y EMY36A (8940 M⁻¹ cm⁻¹) y PduL (3034 M⁻¹ cm⁻¹), considerando su secuencia proteica correspondiente.

3.11.4. Cristalización de la EM.

Brevemente, el cristal de la EM-AYWB se obtuvo utilizando una disposición de gota colgante, con la solución de reserva consistiendo en 30% (p/v) PEG 4000; 0,1 M Tris-HCl pH 8,5; 0,2 M MgCl₂ a 20° C, con la proteína a una concentración de 8,8 mg/ml en 100mM Tris-HCl pH 8,0; 5 mM NAD; 5 mM ADP; 40 mM piruvato; 10 mM MgCl₂; 10% (v/v) glicerol y a 20° C. Luego se realizó una crioprotección agregando lentamente a la gota la solución correspondiente [20% (v/v) glicerol; 30% (p/v) PEG 4000; 0,1 M Tris-HCl pH 8,5; 0,2 M MgCl₂; 5 mM NAD; 5mM ADP; 40 mM piruvato]. Luego, los cristales se remojaron rápidamente en solución de crioprotección 100% y se congelaron rápidamente en N₂ líquido para almacenarlos hasta que se analizaron.

3.11.5. Procesamiento de datos de difracción, determinación de la estructura y procedimientos de refinamiento.

La descripción del procesamiento de los datos de difracción de rayos-X, la determinación de la estructura de la EM-AYWB y los procedimientos para el refinamiento de la estructura se encuentran detallados en [59].

3.11.5. Análisis de secuencia y estructurales.

Las secuencias proteicas se obtuvieron de bases de datos no redundantes del NCBI y las estructuras tridimensionales de la página del PDB (Protein Data Bank) utilizando la EM como molde. Las estructuras se analizaron utilizando el PyMOL 9v.1.8.6; Schrödinger) y PISA [60].

3.12. Ensayos de actividad enzimática.

3.12.1. Ensayos de actividad para la EM con NAD o NADP.

El pH óptimo para la EM se determinó utilizando los siguientes 3 buffers: 50mM MES (pH 5,5 a 6,5); 50mM Tricina-MOPS (pH 7 a 7,5); y 50mM Tris-HCl (pH 7,5 a 8,5). La descarboxilación oxidativa del L-malato por la EM se monitoreó utilizando ensayos espectrofotométricos mediante el agregado del sustrato NAD o NADP y malato a concentraciones variables, en un volumen final de 0,5ml; junto a una mezcla de reacción estándar conteniendo 100 mM Tris-HCl (pH 8,2); 0,25 mM MnCl₂ or 5mM MgCl₂. Todas las concentraciones de sustrato reportadas se refieren a su forma libre, sin acomplejar y se calcularon considerando la constante de disociación de diferentes complejos formados (Mg²⁺-NADP, Mn²⁺-NAD, Mg²⁺-malato y Mn²⁺-malato). La reacción se comenzó con la adición de L-malato y se registró la absorbancia a 340nm y a 30° C instantáneamente. Se definió una unidad de enzima como la cantidad de enzima que cataliza la producción de 1mmol de NAD(P)H por minuto. Para los cálculos se utilizó un coeficiente de absorción de 6,22mM⁻¹ cm⁻¹ para el NAD(P)H. Los parámetros cinéticos se calcularon a partir de experimentos realizados por triplicado y se sometieron a regresión no lineal utilizando las siguientes ecuaciones [61], [62]:

Michaelis-Menten: $v = \frac{V_{max}S}{K_m + S}$ Donde S es la concentración de sustrato, Km es la constante de Michaelis y Vmax es la velocidad máxima de reacción.

Hill: $v = \frac{V_{max}S^n}{S_{0,5}^n + S^n}$ Donde S es la concentración de sustrato, $S_{0,5}$ es la concentración de sustrato en el punto de semi saturación, n es el coeficiente de Hill y V_{max} es la velocidad máxima de reacción.

Dos sitios: $v = \frac{V_1SK_2 + V_2S^2}{K_1K_2 + SK_2 + S^2}$ Donde S es la concentración de sustrato, K_1 es la constante de disociación del sustrato en el sitio catalítico, K_2 es la constante de disociación del sustrato en el sitio regulatorio, V_1 es la velocidad máxima cuando el sitio regulatorio está vacío y V_2 es la velocidad máxima cuando el sitio regulatorio está ocupado.

Todos los procedimientos de ajuste de datos se realizaron con el programa Sigma Plot 12.0. Los activadores o inhibidores potenciales de la actividad enzimática se analizaron midiendo la actividad de la EM a pH 8,2 en ausencia o presencia de 0,5; 1 o 2mM de succinato, fumarato, citrato, glucosa 6-fosfato, aspartato, glicina, glutamato, glutamina, ADP, ATP o acetil-fosfato o 20 o 50mM de CoA o acetil-CoA. El pH final y las concentraciones de metal se corroboraron después de la adición de los metabolitos, en caso de ser necesario. La concentración de malato utilizada para la evaluación de los metabolitos fue de 2mM, mientras que la concentración del cofactor NAD fue de 0,05mM y de NADP fue de 0,08mM.

3.12.2. Ensayos de actividad para la PduL.

La actividad de la PduL en la dirección de la síntesis de acetil-CoA (reacción directa) se ensayó a 30° C mediante el monitoreo de la formación del enlace tioéster del acetil CoA a 233nm ($\epsilon_{233nm}=55,55 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La mezcla de reacción contenía 50mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM KCl; 10 mM acetil fosfato de litio; 0,2 mM litio-CoA y 2mM ditiotreitól [63]. La reacción reversa (síntesis de acetil-fosfato) se monitoreó midiendo la liberación de CoA dependiente de fosfato del acetil-CoA con el agente tiol de Ellman DTNB, midiendo la formación del anión tiofenolato a 412nm ($\epsilon_{412nm}=513600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La mezcla de reacción contenía 50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 20 mM KCl; 0,1 mM DTNB; 0,1 mM acetyl-CoA y 5 mM KH_2PO_4 [63]. Cuando se ensayaron diferentes compuestos como inhibidores potenciales o activadores de la actividad PTA de PduL, ambas direcciones de la reacción se midieron a pH 8 en ausencia o presencia de 0,5; 2 o 4mM de los compuestos piruvato, glutamato, glutamina, alanina,

acetato, ATP o ADP. Las concentraciones de sustrato se modificaron para ajustarse a condiciones subsaturantes para cada reacción: 4 mM CoA y 2 mM acetyl-fosfato para la reacción directa y 0,02 mM acetyl-CoA para la reacción reversa. Todas las medidas se hicieron al menos por triplicado.

3.12.3. Ensayos de actividad para la EMY36A.

Se intentó medir la actividad enzimática de la EMY36A utilizando el mismo protocolo general que el descrito para la EM salvaje (3.12.1).

3.13. Cromatografías.

3.13.1. Cromatografía de exclusión molecular.

La masa molecular de la EM, EMY36Ay de la PduL nativas y recombinantes se determinaron por cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna HiPrep Sephacryl 16/60 300 HR con una capacidad de 120ml (GE Healthcare Life Sciences). La columna se equilibró con 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) y glicerol 10% (v/v) y se calibró utilizando estándares de masa molecular (Sigma). Las muestras y los estándares se aplicaron por separado en un volumen final de 50µl a un flujo constante de 1ml/min.

*Integración de señales
de luz y temperatura a
través del fotorreceptor*

BlsA

4. Integración de señales de luz y temperatura a través del fotorreceptor BlsA.

4.1. Introducción

Se ha reportado que la fotorregulación por luz azul depende de la temperatura en *A. baumannii*, ocurriendo a 24° C, pero no a 37° C [12]. Además, se reportó que los niveles del transcripto *blsA* son menores a 37° C que a 24° C en células obtenidas de placas de motilidad [12].

Para profundizar nuestro entendimiento de la dependencia con la temperatura de la funcionalidad de BlsA, en este trabajo de tesis hemos determinado el rango de temperatura de funcionamiento de BlsA, estudiando la expresión de *blsA* a nivel transcripcional y de los niveles del fotorreceptor en la célula, así como las perturbaciones potenciales en el nanoambiente del FAD en BlsA a diferentes temperaturas.

4.2. Resultados y discusiones

4.2.1. Determinación de la temperatura crítica de transición de la regulación por luz en *Acinetobacter*.

Acinetobacter baumannii puede persistir en nichos con marcadas diferencias de temperatura: el medio ambiente, con temperaturas moderadamente bajas y el hospedador humano, con temperaturas más altas de entre 33° C y 37° C. Se ha reportado anteriormente que la cepa ATCC 17978 de *A. baumannii* presenta regulación por luz a 24° C, pero no a 37° C [12]. Específicamente, cuando se inocula esta cepa en placas de Petri conteniendo el medio semisólido *Swimming-Agarose* (SA) a 24° C, la luz inhibe totalmente su motilidad, mientras que en oscuridad se extiende ocupando toda la superficie de la placa. Cuando se incubaba a 37° C, no se observa inhibición de la motilidad ni en luz ni en oscuridad.

4.2.1.1. La modulación por luz de la motilidad de *A. baumannii* se da a temperaturas de 24° C o menores.

Se hicieron experimentos de motilidad trabajando en un rango de temperaturas entre 18° C y 37° C, para comprender el mecanismo de regulación por luz en *A. baumannii* de

manera más detallada y con el objetivo de identificar si existe una temperatura crítica a la que se produce un cambio drástico en la fotorregulación o si es un proceso gradual.

Los resultados muestran que el proceso sería más similar a la primera situación planteada. A temperaturas de 24° C o menores y en condiciones de luz azul la inhibición de la motilidad es total, mientras que en oscuridad no se produce tal inhibición. Por el contrario, a temperaturas de 25° C o mayores, la motilidad no se inhibe ni en condiciones de luz azul ni en oscuridad (Figura 4.1 y 4.2).

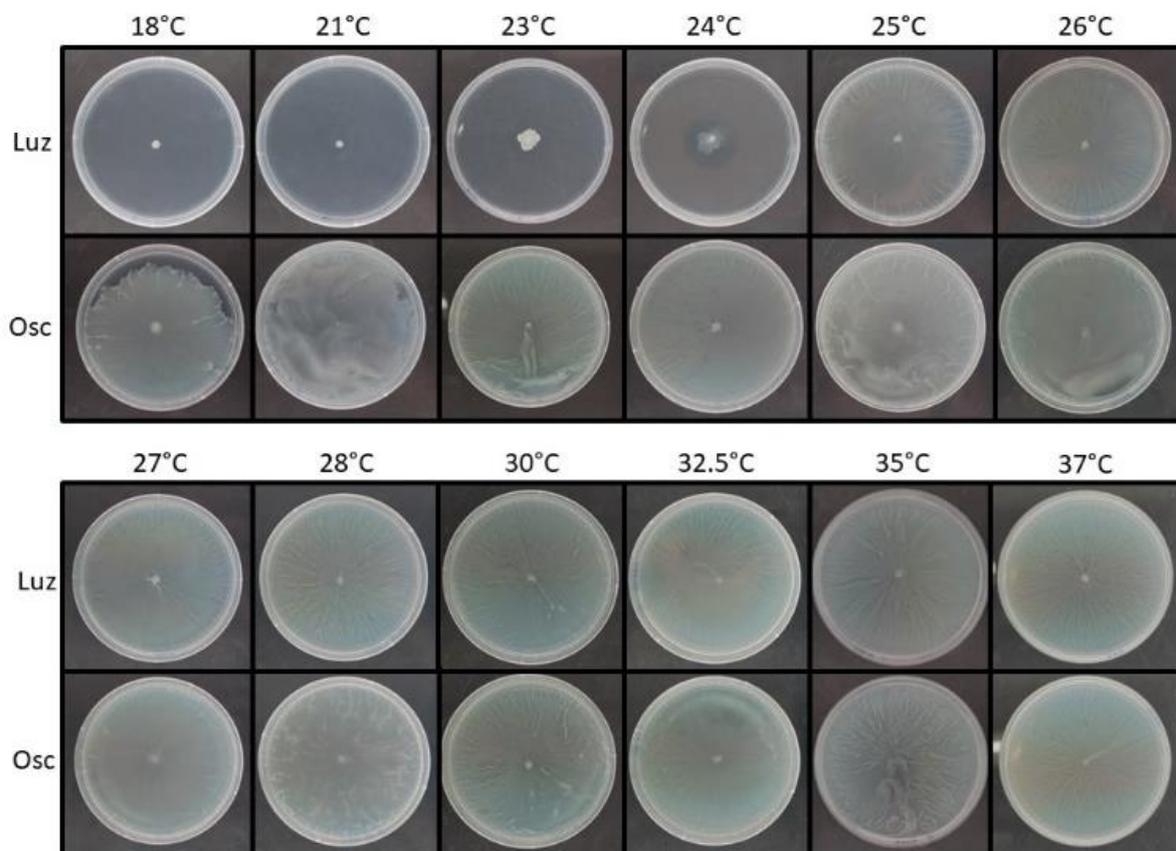


Figura 4.1. Ensayo representativo de la motilidad de *A. baumannii* ATCC 17978 a distintas temperaturas en el rango de 18° C a 37° C y en condiciones de luz y oscuridad.

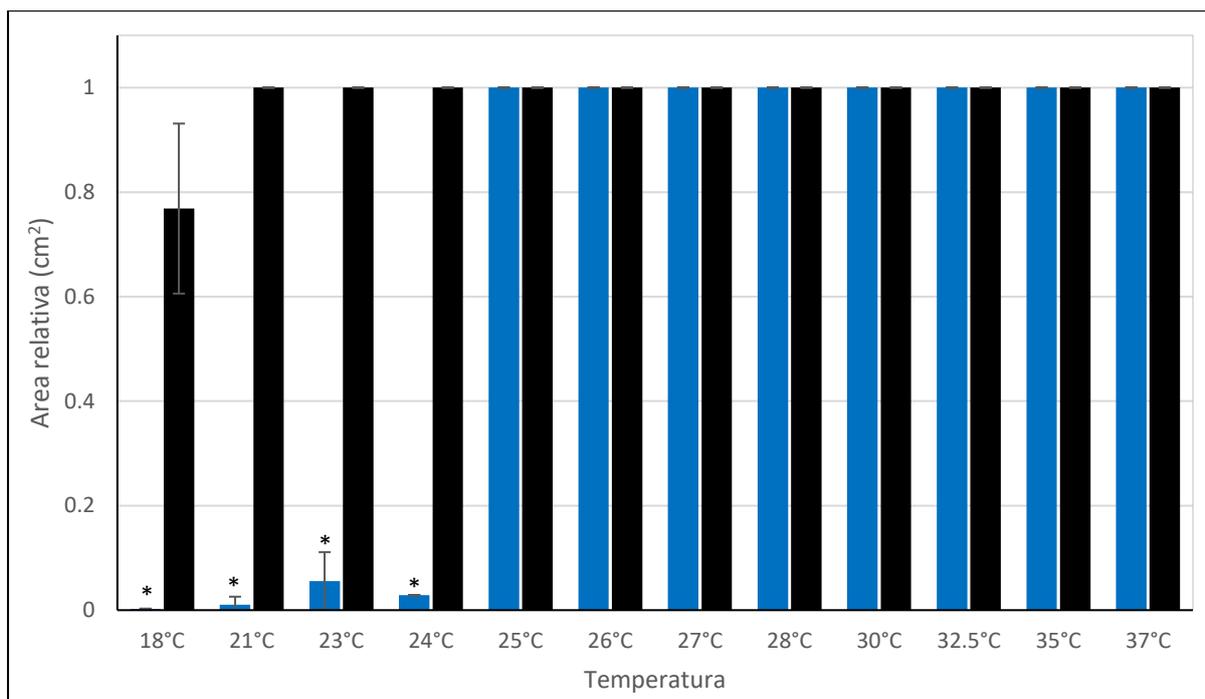


Figura 4.2. Cuantificación del área de motilidad de *A. baumannii* ATCC 17978 en función de la luz y la temperatura. Las barras blancas representan temperaturas de 24° C o menores, mientras que las barras rellenas representan temperaturas de 25° C o mayores. Los asteriscos indican valores estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

Esto indica que la cepa salvaje ATCC 17978 es capaz de fotorregular la motilidad a temperaturas de 24° C o menores, mientras que pierde esta capacidad a temperaturas de 25° C o mayores. Por lo tanto, se observa una temperatura crítica que define la fotorregulación de la motilidad de la cepa salvaje entre 24° C y 25° C.

4.2.1.2. La expresión del gen *blsA* de *A. baumannii* está modulada por luz a temperaturas iguales o menores a 24° C.

Para dilucidar el mecanismo subyacente que produce este cambio abrupto, se recolectaron células a partir de placas de motilidad a dos temperaturas inferiores y dos superiores a la temperatura crítica (21° C y 23° C, y 26° C y 30° C respectivamente), tanto en luz como en oscuridad. Luego, se evaluaron los niveles de transcripto de *blsA* mediante ensayos de transcripción reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR).

En la figura 4.3 puede observarse que, a las temperaturas ensayadas menores a la crítica, *blsA* se expresa entre 2 y 4 veces más en oscuridad que en luz; mientras que su

expresión se encuentra significativamente reducida (más de 25 veces) a temperaturas superiores a la crítica como 26° C y 30° C, ya sea en luz o en oscuridad.

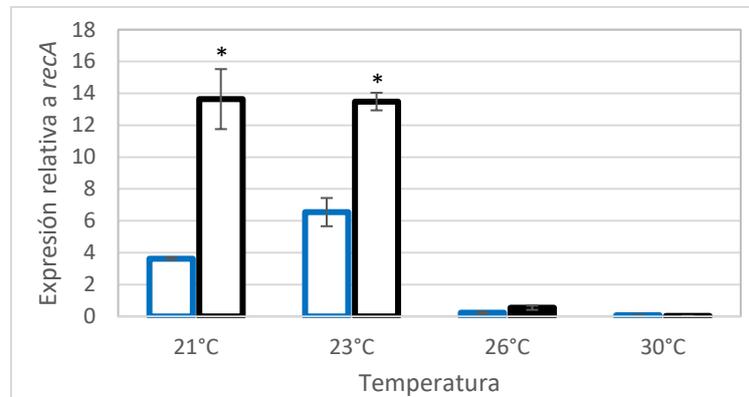


Figura 4.3. Niveles de expresión del gen *bIsA* en células recolectadas a partir de placas de motilidad a dos temperaturas inferiores y dos temperaturas superiores a la temperatura crítica de transición de la fotorregulación. Las barras blancas representan temperaturas de 24° C o menores, mientras que las barras rellenas representan temperaturas de 25° C o mayores. Las barras con contorno azul corresponden a luz azul y las barras con contorno negro corresponden a oscuridad. Los asteriscos indican valores estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

Estos resultados indican que a las dos temperaturas ensayadas por debajo de la temperatura crítica los niveles del transcritto *bIsA* se regulan por luz, mientras que a las temperaturas superiores a la temperatura crítica no hay fotorregulación de los niveles de este transcritto. Esto puede deberse a una modulación de la transcripción o de la estabilidad de los ARN mensajeros.

Luego, a partir de muestras obtenidas en condiciones similares a las anteriores, se efectuaron ensayos de inmunodetección del fotorreceptor BlsA. Así, a través de estos estudios se constató la presencia de BlsA a temperaturas menores a la crítica en condiciones de oscuridad, mientras que no se detectó en condiciones de luz. Interesantemente, no se detectó la presencia de BlsA a temperaturas mayores a la crítica, ya sea en luz o en oscuridad (Figura 4.4).

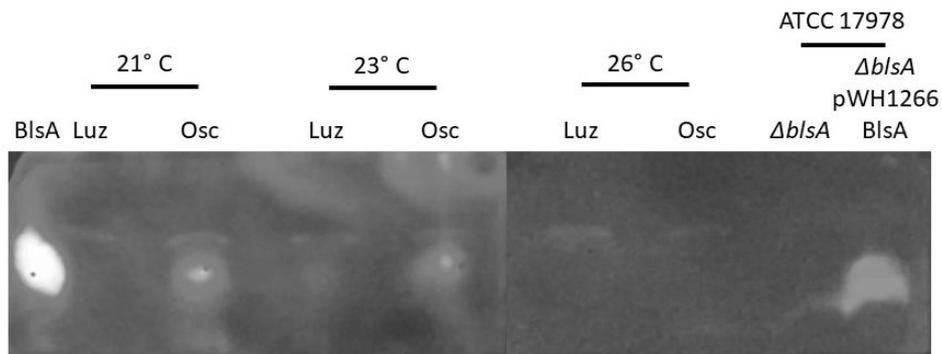


Figura 4.4. Ensayo de inmunodetección de la proteína BlsA de células recolectadas a partir de placas de motilidad utilizando anticuerpos específicos. La calle rotulada como “BlsA” indica que se sembró la proteína recombinante y constituye un control positivo. La calle rotulada como “ $\Delta blsA$ pWH1266-BlsA” indica que se sembró la cepa que sobreexpresa BlsA y constituye otro tipo de control positivo.

4.2.1.3. Biofísica de BlsA.

A fin de estudiar el comportamiento y la integración de las señales de luz y temperatura a través de BlsA a nivel fotoquímico, se expresó esta proteína de manera recombinante y posteriormente se purificó. Luego se confeccionó primeramente el espectro de absorción de la proteína BlsA adaptada a condiciones de oscuridad (es decir, en su estado basal de energía, bBlsA) a 15° C (Figura 4.5).

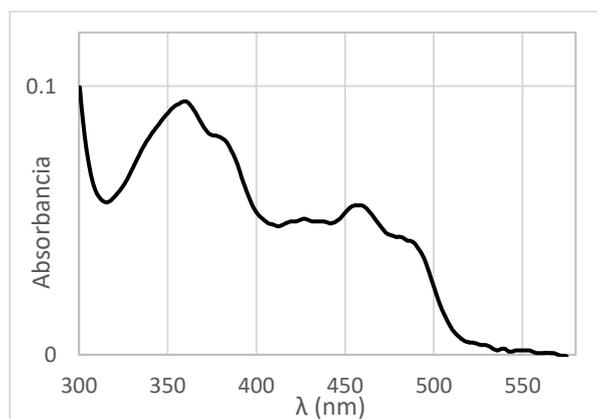


Figura 4.5. Espectro de absorción UV-Vis a 15° C de la proteína BlsA adaptada a condiciones de oscuridad.

Este espectro muestra un patrón característico de las proteínas que unen flavina, incluyendo dos picos a 360 nm y 459 nm, de los cuales en el último se observa una estructura vibrónica definida con hombros a 426 nm y 482 nm, los que sugieren que la flavina se ubica en un ambiente apolar.

La relación de absorbancias entre la banda vibracional del hombro de mayor longitud de onda y la del máximo (482nm/459nm, A_h/A_{max}), se propuso como un parámetro conveniente para monitorear los cambios ambientales en el microentorno del FAD [64]. Por lo tanto, se midió la variación de la relación de absorbancias (A_h/A_{max}) en función de la temperatura (Figura 4.6) y se observó que en el caso del FAD unido a BlsA, el valor del parámetro A_h/A_{max} es prácticamente constante en el rango de temperaturas que va desde 15,6° C hasta 24,2° C y luego, a temperaturas superiores, cae abruptamente hasta alcanzar valores similares a aquellos registrados para el FAD libre en solución [58]. Así, a temperaturas mayores a 24° C se evidencian cambios dramáticos en la estructura proteica interna, indicando que el FAD se encuentra con una mayor exposición al solvente [58].

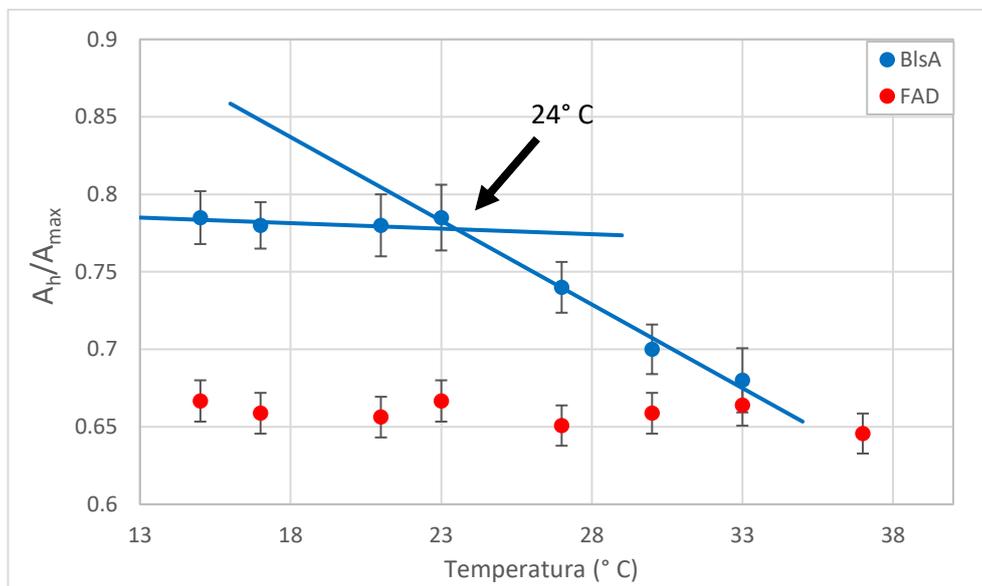


Figura 4.6. Variación del parámetro A_h/A_{max} en función de la temperatura del FAD unido a la proteína BlsA y libre en solución.

En el mismo sentido, a través de estudios de anisotropía de fluorescencia, se observa que los valores, van disminuyendo a medida que aumenta la temperatura (Figura 4.7).

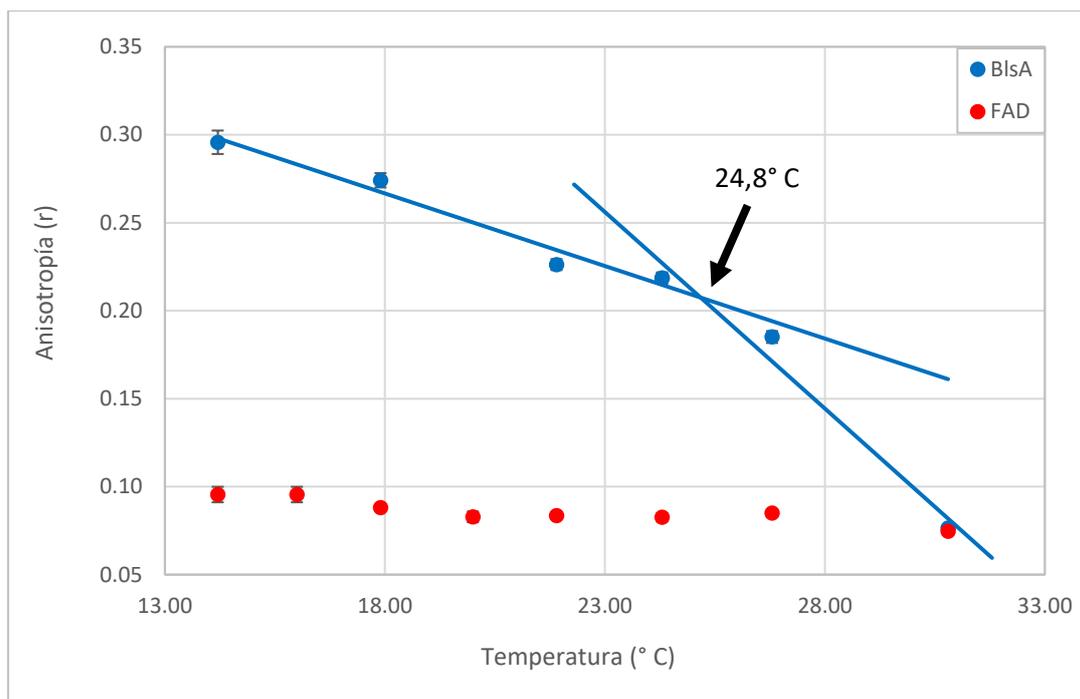


Figura 4.7. Anisotropía de fluorescencia en función de la temperatura para el FAD en solución (puntos rojos) y el FAD unido a BlsA (puntos azules).

Esto indicaría que se produce una pérdida de rigidez en la nanocavidad del FAD a medida que la temperatura aumenta [58].

4.2.1.4. Discusión.

Los resultados presentados en esta sección indican que existe una correlación entre la fotorregulación de la motilidad, los niveles de ARN mensajero de *blsA* y los niveles y el mantenimiento de la estructura de la proteína BlsA.

Específicamente, se observó que a temperaturas de 24° C o menores *A. baumannii* es capaz de modular la motilidad y la expresión de *blsA* en función de la luz y que BlsA mantiene una estructura interna tal que el FAD no se encuentra expuesto al solvente. Por el contrario, a temperaturas de 25° C o mayores no hay modulación por luz de la motilidad ni expresión diferencial del gen *blsA* (Figuras 4.3 y 4.4) y BlsA pierde su estructura interna y la rigidez de la nanocavidad del FAD, exponiéndolo al solvente.

En este sentido, se ha reportado que la motilidad de *A. baumannii* es completamente dependiente del *pili* tipo I a 24° C y que la expresión del gen *prpA*, que codifica por uno de sus componentes está modulada por luz y que es dependiente de BlsA. En cambio, a 37° C

tiene que haber otro sistema que contribuye a la motilidad y que también está modulado por luz [65].

Todo esto indicaría que los niveles del fotorreceptor BlsA, su estructura interna y la rigidez de la nanocavidad del FAD podrían ser los factores que permitirían que *A. baumannii* sea capaz de modular la motilidad en función de la luz a temperaturas de 24 ° C o menores.

Por lo tanto, podemos decir que hay dos niveles de control de la percepción de la señal lumínica. Uno es al nivel de la regulación de la expresión del gen *blsA*, mientras que el otro es a nivel biofísico de BlsA. En este segundo caso, la respuesta es mucho más rápida que en el caso de la regulación de la expresión génica, por lo que se postula que este mecanismo podría ser crítico para restringir la fotorregulación instantáneamente, por ejemplo, frente a cambios repentinos de temperatura, cuando el fotorreceptor aún se encuentra presente en la célula.

4.2.2. La dependencia de la fotorregulación de la motilidad con la temperatura es un proceso reversible.

4.2.2.1. Reversibilidad de la regulación por luz de la motilidad de *A. baumannii* en función de la temperatura.

Listeria monocytogenes es una bacteria Gram positiva que detecta la luz azul a través de la proteína sensora de unión a FAD, Lmo0799 [66].

Cuando se hicieron ensayos de motilidad a 23°C para *L. monocytogenes* alternando las condiciones entre luz y oscuridad en ciclos de 12hs, fue capaz de producir sustancias poliméricas extracelulares solo en condiciones de luz, mostrando reversibilidad en cada ciclo [67].

Inspirados en este hallazgo y sabiendo que *A. baumannii* ATCC 17978 fotorregula la motilidad a temperaturas menores a 24° C, pero no así a temperaturas mayores a 25° C (como se demostró en la sección 4.2.1), ensayamos su comportamiento al exponer dicha cepa alternadamente a ciclos de 6 horas de incubación a 23° C y 37° C en condiciones constantes de luz. De esta manera, evaluar si el fenotipo observado es reversible en función de los cambios de temperatura.

En las figuras 4.8; 4.9a y 4.9b se puede observar que cada vez que las placas se incubaron durante 6 horas a 37° C en condiciones de luz azul, se produjo un movimiento de

las células sobre la superficie del medio SA, evidenciándose la falta de inhibición de la motilidad a esta temperatura, incluso si previamente esta cepa estuvo expuesta a 23° C. Esto se condice con los resultados reportados anteriormente [12], [23], donde mostramos que a 37° C la cepa salvaje no fotorregula la motilidad, moviéndose tanto en condiciones de luz azul, como en oscuridad y también con los resultados mencionados en la sección 4.2.1 donde demostramos que esta falta de fotorregulación ocurre a temperaturas iguales o mayores a 25° C.

Sin embargo y sorpresivamente, en la segunda incubación de 6 horas a 23° C (de 12 a 18 horas), la luz no logra inhibir la motilidad de esta bacteria, mientras que sí lo hace en la primera y en la tercera incubación a esta temperatura (0 – 6 hs y 24 – 30 hs).

Tal como se reportó anteriormente [12], [23] la luz azul inhibe totalmente la motilidad de la cepa salvaje inoculada en el centro de una placa con medio SA e incubada durante 45 horas a 23° C (control de tiempo completo en luz a 23° C), observándose sólo crecimiento bacteriano en el punto de inoculación (Figura 4.8). En el caso de la placa incubada en oscuridad (control de tiempo completo en oscuridad a 23° C), se observa que no hay inhibición de la motilidad, de modo que las bacterias llegan a diseminarse por toda la superficie del medio SA. Por otro lado, en las placas incubadas a 37° C, tanto en condiciones de luz azul, como en condiciones de oscuridad, no se observa una inhibición de la motilidad, sino que se produce un movimiento de las bacterias por toda la superficie del medio (placas control de tiempo completo en luz u oscuridad a 37° C) (Figura 4.8).

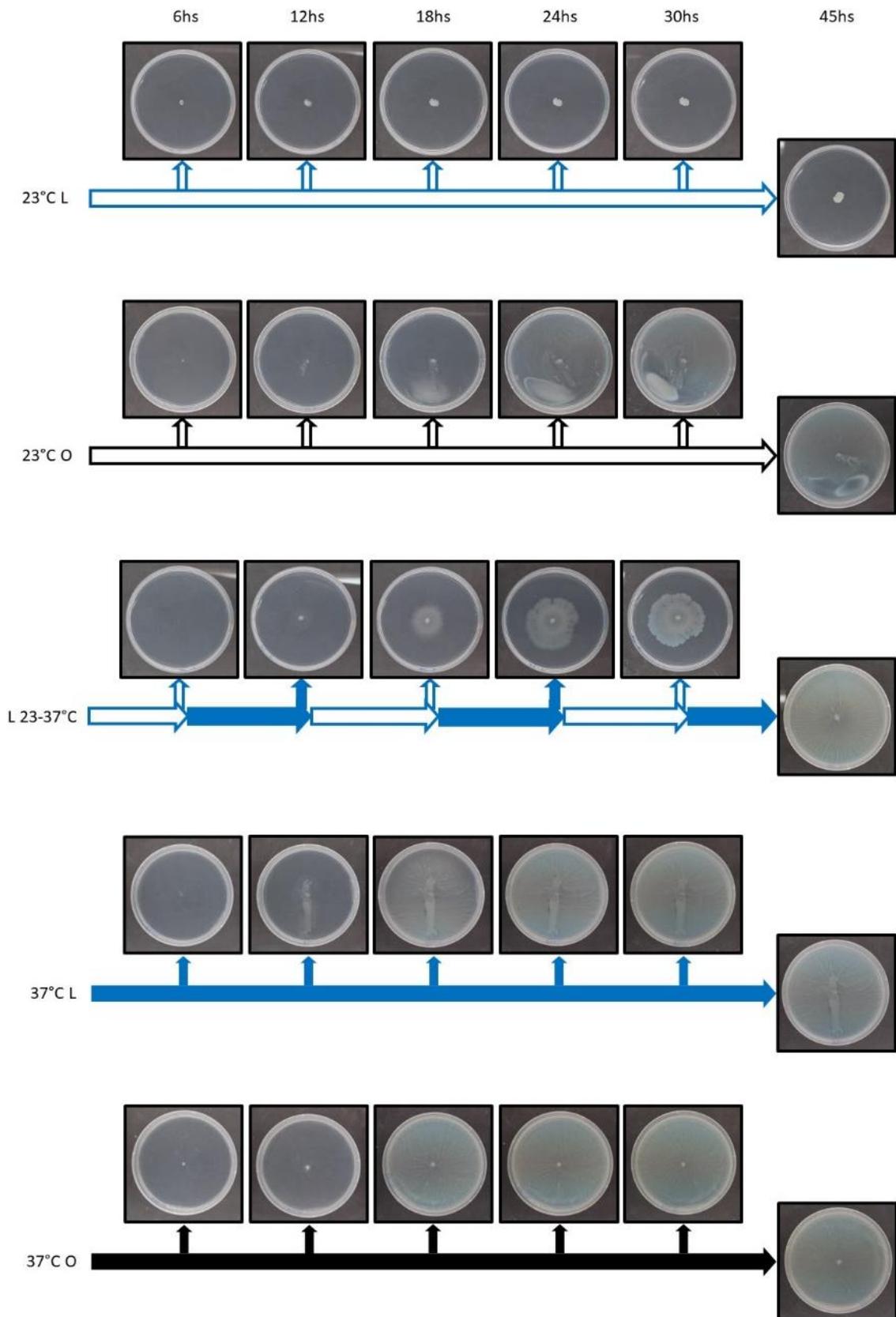


Figura 4.8. Ensayo representativo de la motilidad para la cepa ATCC 17978 de *A. baumannii* en presencia de luz azul alternando entre 23° C y 37° C (flechas blancas con contorno azul y flechas azules alternadas) a intervalos de 6hs. Se observa que las placas control incubadas a 23° C constantemente en luz (representadas por una flecha blanca con contorno azul) no se movieron durante el tiempo que duró el ensayo. Las placas control incubadas a 23° C en oscuridad (flecha

blanca con contorno negro), a 37° C en luz (flecha azul con relleno) y a 37° C en oscuridad (flecha negra con relleno) se movieron progresivamente hasta ocupar toda la placa.

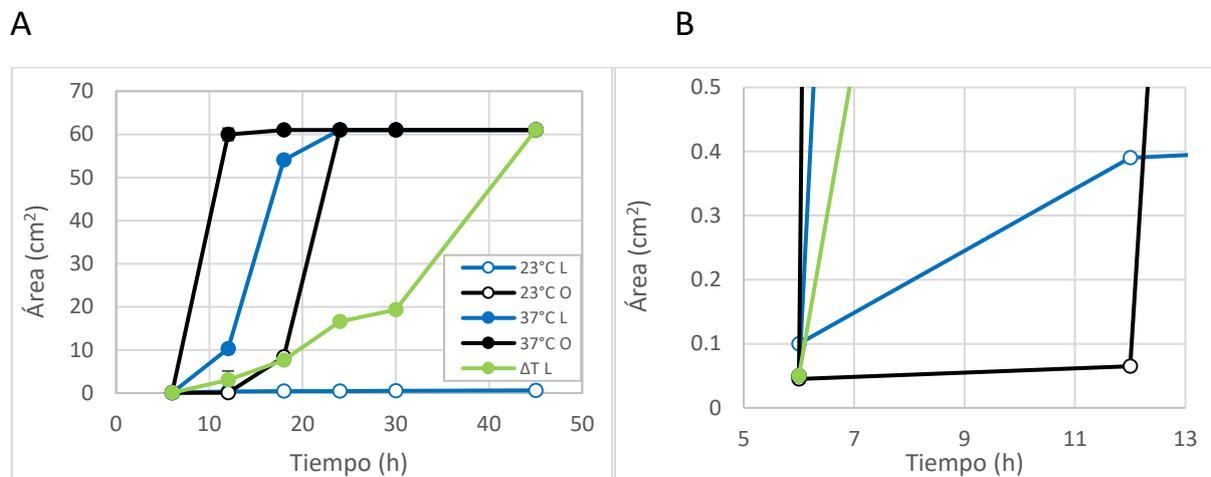


Figura 4.9. A) Cuantificación del área ocupada por las células de la cepa salvaje expuesta a ciclos alternados de luz a 23° C y 37° C (ΔT) y sus controles a 23° C en luz azul y en oscuridad, en función del tiempo. B) Ampliación de la Figura 9A para los tiempos comprendidos entre 5 y 13 horas. Los puntos blancos con contorno azul indican incubaciones en luz azul y a 23° C. Los puntos blancos con contorno negro indican incubaciones en oscuridad y a 23° C. Los puntos azules rellenos indican incubaciones en luz azul y a 37° C. Los puntos negros rellenos indican incubaciones en oscuridad y a 37° C.

El hecho de que las bacterias se muevan en la segunda incubación a 23° C podría deberse a la fase de crecimiento en la que se encontraban, sumada a la adaptación a la temperatura anterior. Las 6 horas de incubación a 37° C (6 – 12 hs) podrían ser suficientes como para que se inhiba la expresión de *blsA*, se inactive el fotorreceptor ya sintetizado y se active la expresión de todos los genes involucrados hasta dar el resultado de la motilidad. Cuando la bacteria vuelve a ser incubada durante 6 horas a 23° C (12 – 18 hs), sumado a la fase de crecimiento, la baja cantidad de BlsA presente que recupera su conformación activa y funcional, no lograría llegar a inhibir la motilidad, tal vez por el tiempo requerido por cada paso en la cadena de la transducción de la señal, así como tampoco se llegaría a expresar una cantidad significativa de *blsA* para aumentar los niveles del producto génico y producir el efecto correspondiente.

En la siguiente etapa en que esta bacteria fue incubada a 23° C (24 – 30 horas) después de haber sido adaptada a 37° C, puede haber cambiado la fase de crecimiento y este motivo puede ser suficiente para que el apagado y/o la inhibición de toda la maquinaria necesaria para la motilidad y los componentes de la cascada de transducción de la señal se produzca más rápido, ya sea a nivel transcripcional o post-transcripcional.

4.2.2.2. La capacidad de BlsA de realizar el fotociclo es reversible en función de la temperatura.

En este sentido, se evaluó mediante herramientas biofísicas si el fotorreceptor tiene la capacidad de revertir y ciclar entre el estado basal de energía y el estado excitado de señalización, de forma coherente con lo observado fenotípicamente y en función de la temperatura. Para ello se hizo un espectro de absorción de la proteína adaptada a condiciones de oscuridad (bBlsA) e iluminada (en su estado excitado, eBlsA) (Figura 4.10a) y se calculó el espectro diferencial entre la proteína excitada y la proteína adaptada a oscuridad (Figura 4.10b).

Dado que la mayor diferencia en absorbancia entre ambos estados se da a 510 nm, se utilizó esta longitud de onda para confeccionar el perfil cinético de la proteína BlsA (Figura 4.11).

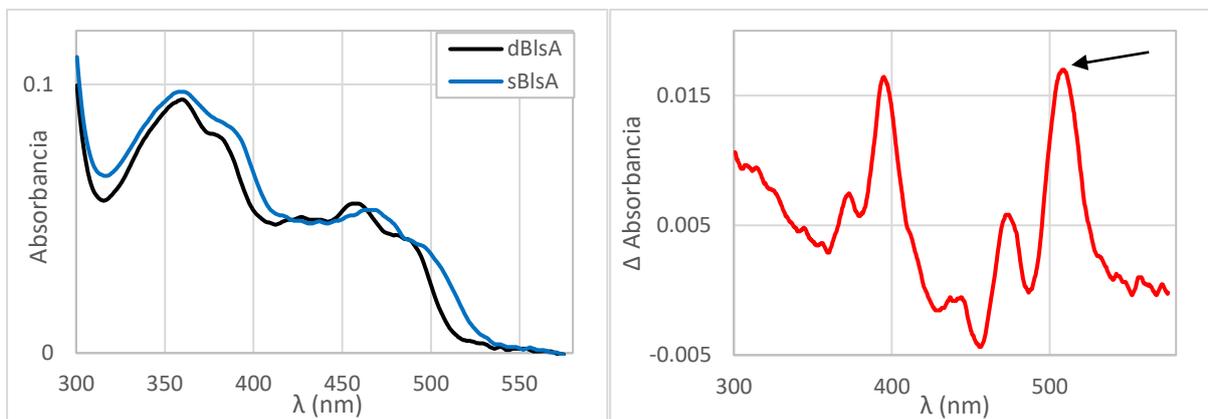


Figura 4.10. A) Espectro de absorción UV-Visible de la proteína BlsA adaptada a condiciones de oscuridad (bBlsA, línea negra) y en condiciones de luz azul (eBlsA, línea azul) a 15,6° C. B) Espectro diferencial resultado de eBlsA – bBlsA. La flecha indica el pico a 510 nm.

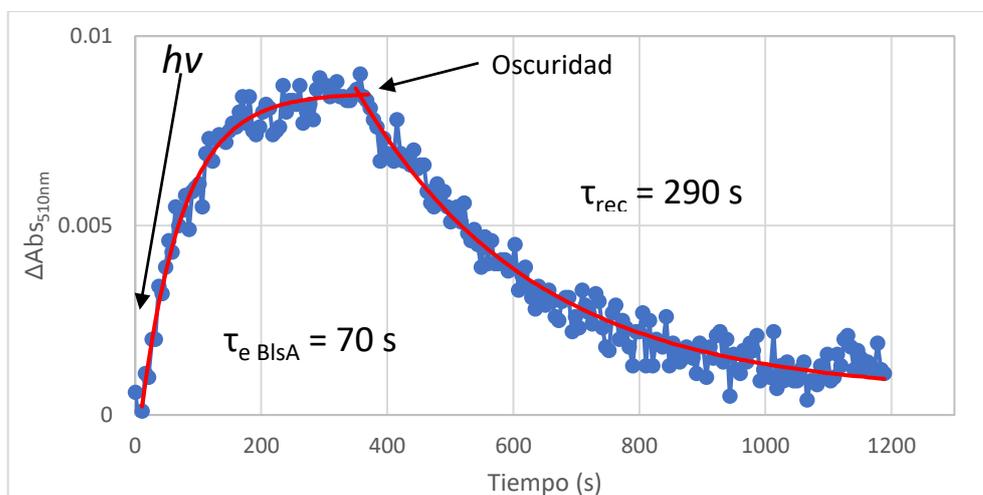


Figura 4.11. Perfil cinético a 510 nm al iluminar BlsA con luz azul (460 nm), seguido de un período de oscuridad a 15° C.

Se puede observar que cuando la proteína BlsA adaptada a condiciones de oscuridad (bBlsA) se irradia con luz de color azul (460 nm), se produce un pasaje de la población al estado excitado de energía, llegando a un máximo de absorbancia a los 360 segundos aproximadamente, lo que se corresponde con un pasaje de la población completa al estado excitado (eBlsA). En ese momento se dejó de irradiar la muestra, de modo que se produce la vuelta al estado basal de energía de BlsA, lo que se ve como un decaimiento en la absorbancia a 510 nm, hasta que toda la población vuelve al estado basal de energía. El tiempo que tarda la mitad de la población de bBlsA en alcanzar el estado excitado es de 70 s, mientras que el tiempo que tarda la mitad de la población eBlsA en relajarse y volver al estado basal es de 290 s, tal como lo indica el parámetro $\tau_{e\text{ BlsA}}$ y τ_{rec} respectivamente.

Experimentos de diálisis indicaron que a 15° C, BlsA se encuentra soluble y el cofactor permanece unido. En cambio, a 37° C, una fracción significativa de bBlsA sufre un cambio conformacional y se agrega, mientras que la fracción soluble es capaz de retener el cofactor.

Éste experimento de diálisis confirma que después de calentar la proteína a 37° C, sólo el 30% de BlsA permanece soluble. Tras enfriarse nuevamente a 15° C, la bBlsA recuperada es capaz de responder al estímulo de la luz azul, para formar el estado excitado eBlsA, el cual en condiciones de oscuridad se vuelve a relajar al estado basal bBlsA, tal como se muestra en la figura 4.12.

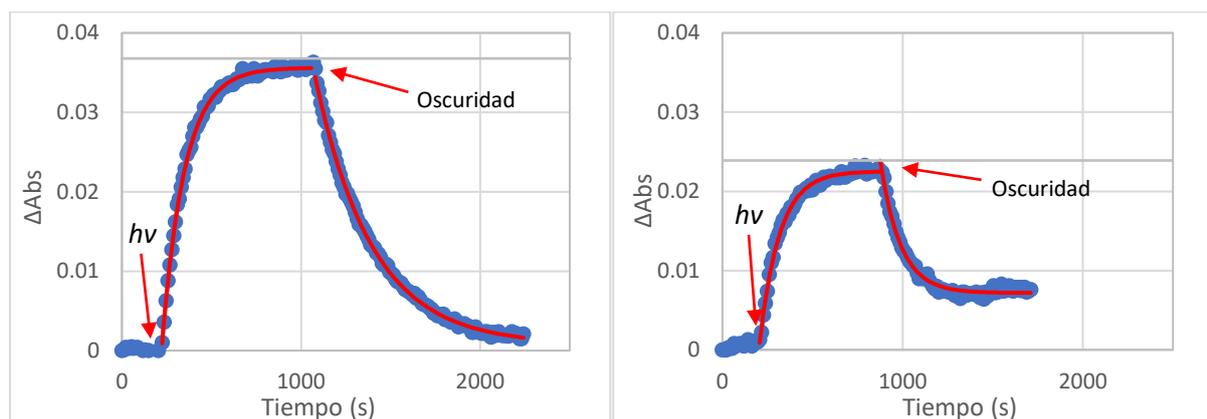


Figura 4.12. Perfil cinético de BlsA a 15° C, medido a 510 nm. A) Antes de calentar la muestra a 37° C. B) Después de calentar la muestra a 37° C y volver a enfriarla a 15° C.

4.2.2.3. La modulación por luz de la motilidad es reversible a temperaturas cercanas a la crítica.

Sabiendo que la temperatura crítica de transición de la fotorregulación entre la inhibición de la motilidad por luz y la falta de inhibición es entre 24° C y 25° C, se quiso ensayar el comportamiento y la posible reversibilidad del fenotipo de la cepa 17978 a temperaturas más cercanas a estas. Para ello, se hicieron experimentos similares a los mencionados en el apartado 4.2.2.1, incubando las placas con el medio semisólido SA, inoculadas en el centro con la cepa ATCC 17978, durante 6 horas de forma alternada a 23° C y 27° C.

Como se puede observar en las figuras 4.13; 4.14a y 4.14b, los resultados obtenidos en este ensayo coinciden con los del ensayo de la sección anterior (Figuras 4.8, 4.9a y 4.9b), donde en ambos casos, en las incubaciones en luz azul a temperaturas superiores a la temperatura crítica (24° C - 25°C), la motilidad de la cepa salvaje no es inhibida, mientras que, excepto por la segunda incubación a 23° C, en las incubaciones a temperaturas menores a la temperatura crítica la luz inhibe la motilidad.

Como se vio anteriormente, en las placas control incubadas a 23° C la luz azul inhibe la motilidad de la cepa salvaje, mientras que esta inhibición no se produce en oscuridad. En las placas control incubadas a 27° C la motilidad no está inhibida ni en luz azul, ni en oscuridad.

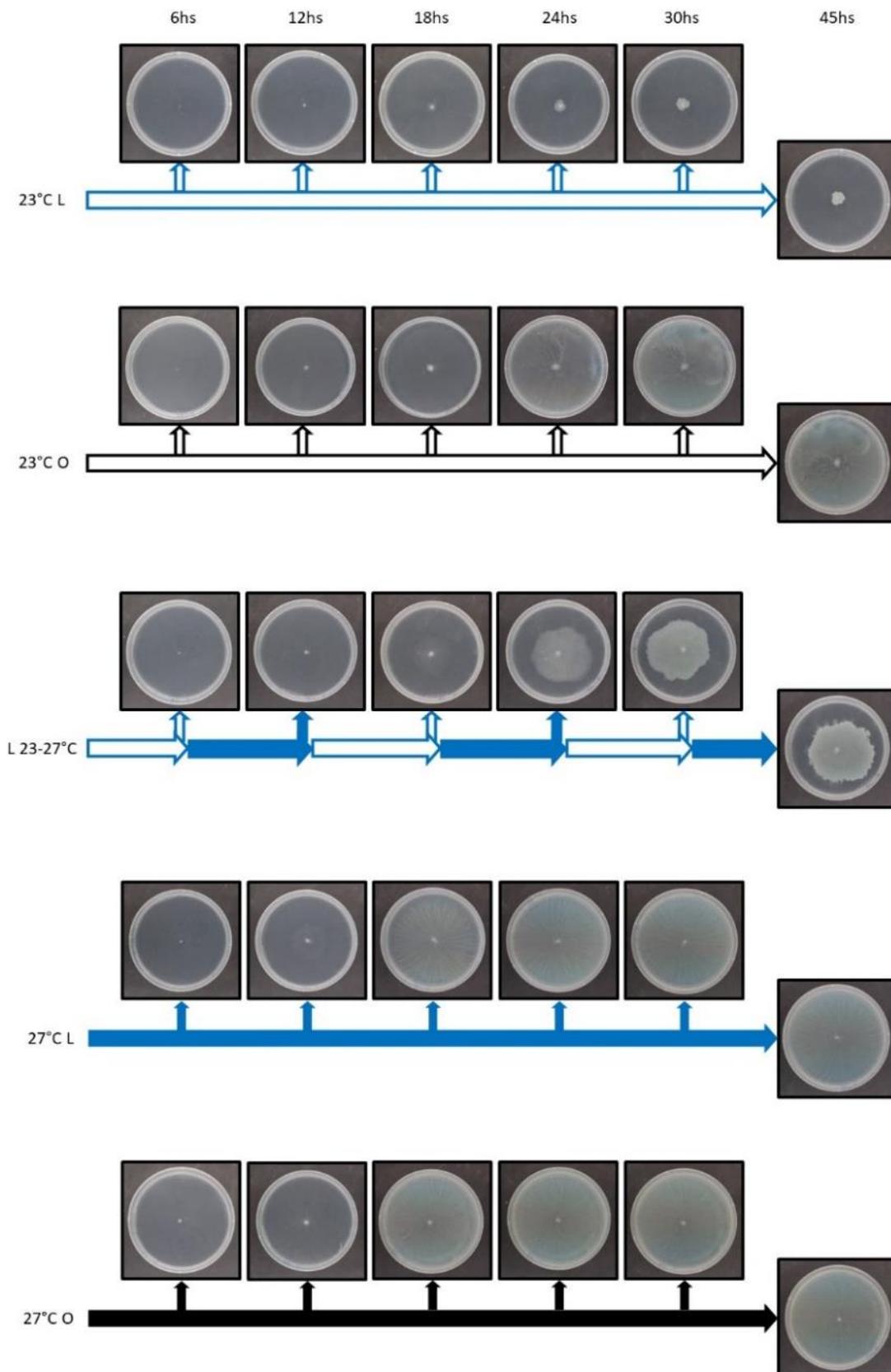


Figura 13. Ensayo representativo de la motilidad para la cepa ATCC 17978 de *A. baumannii* en presencia de luz azul alternando entre 23° C y 27° C (flechas blancas con contorno azul y flechas azules alternadas) a intervalos de 6hs. Se observa que las placas control incubadas a 23° C constantemente en luz (representadas por una flecha blanca con contorno azul) no se movieron durante el tiempo que duró el ensayo. Las placas control incubadas a 23° C en oscuridad (flecha

blanca con contorno negro), a 27° C en luz (flecha azul con relleno) y a 37° C en oscuridad (flecha negra con relleno) se movieron progresivamente hasta ocupar toda la placa.

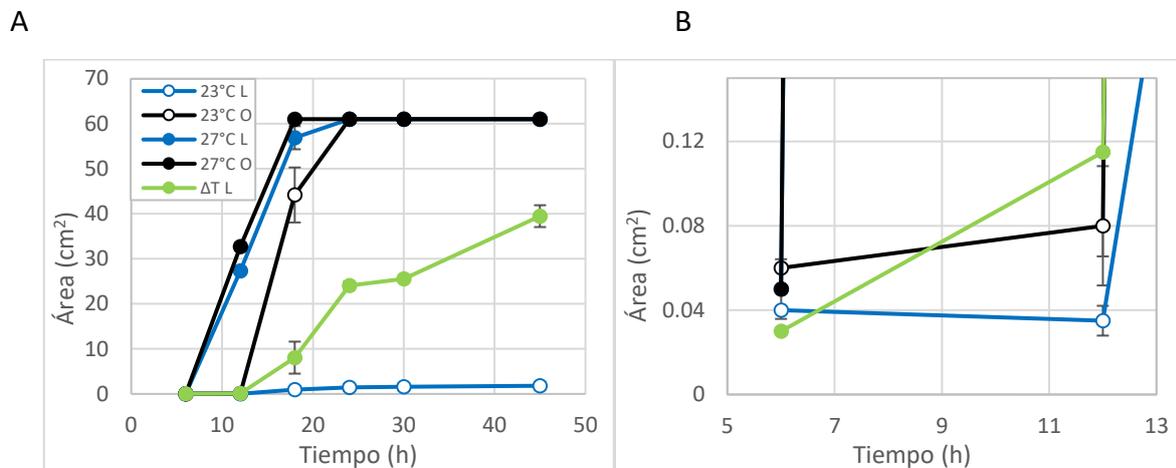


Figura 14. A) Esquema del ensayo de motilidad de *A. baumannii* ATCC 17978 expuesta a ciclos alternados de luz a 23° C y 27° C (ΔT , en verde) y sus controles a 23° C en luz azul y en oscuridad. B) Ampliación de la figura A para los tiempos comprendidos entre 5 y 13 horas. Las curvas representadas con puntos blancos indican temperaturas de 23° C. Las curvas representadas por puntos rellenos indican temperaturas de 27° C. Color azul indica luz azul, mientras que color negro indica oscuridad. La curva de color verde corresponde al ensayo de cambio de condiciones entre 23° y 27° C, en luz azul.

Nuevamente, la hipótesis se basa en la conjunción de factores tales como la fase de crecimiento de las bacterias, sumado al equilibrio entre la síntesis y degradación de la proteína BlsA y su estabilidad a estas temperaturas cambiantes. También se demuestra con esto una reversibilidad en este fenotipo cuando se expone a las bacterias a temperaturas cercanas al punto crítico de transición de la fotorregulación.

4.2.2.4. Reversibilidad de la fotorregulación de la motilidad a 23° C.

A. baumannii tiene un estilo de vida en el que alterna entre un ambiente fuera del hospedador humano y otro durante la infección. En su estado libre en el ambiente natural, esta bacteria está expuesta a cambios constantes en las condiciones de iluminación, entre la luz y la oscuridad, producto del fotoperíodo. Por esto se ensayó la capacidad de esta bacteria de revertir la fotorregulación en función de la exposición a períodos de 6 horas de luz azul o de oscuridad, a 23° C.

Como se puede observar en las figuras 4.15; 4.16A y 4.16B, en el caso de la placa que se incubaba a 23° C y alternadamente en luz azul y oscuridad, se ve que, en una primera etapa de incubación en luz, la bacteria crece en el punto de inoculación. En la segunda incubación,

en oscuridad, la bacteria se desplaza por la superficie de la placa lo que indica la falta de inhibición de la motilidad. En la siguiente incubación en luz azul, al contrario de lo que era de esperarse, la luz no inhibe la motilidad de esta cepa. En la etapa siguiente en oscuridad, se produce un aumento del área ocupada por las bacterias, lo que indica que éstas se movieron por la superficie del medio SA. En la incubación siguiente en luz azul, no se produce un aumento significativo del área ocupada por las células, lo que indica que nuevamente la luz inhibe la motilidad de esta cepa. Finalmente, en la última etapa en oscuridad, las bacterias llegan a ocupar toda la superficie del medio.

En el caso de los controles, como se pudo observar previamente, la luz azul inhibe la motilidad de la cepa salvaje a 23° C, mientras que no se observa inhibición de la motilidad en condiciones de oscuridad a esta misma temperatura [12], [23] y Figura 4.1 en la presente tesis).

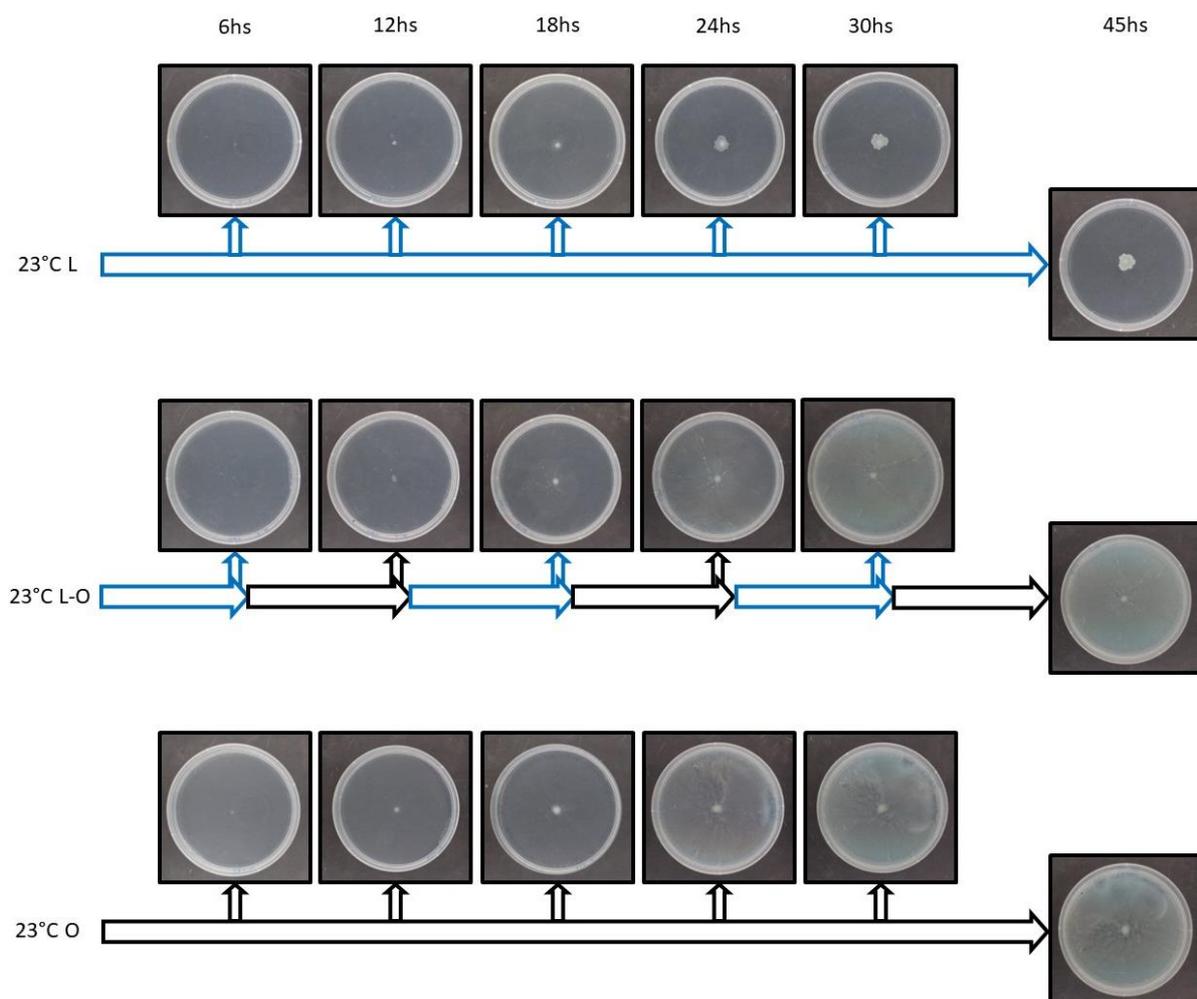


Figura 15. Ensayo representativo de la motilidad a 23° C para la cepa ATCC 17978 de *A. baumannii*, con intervalos de incubación de 6hs en condiciones de luz y oscuridad (flechas blancas con contorno azul y con contorno negro alternadas). Se observa que las placas control incubadas a 23° C constantemente en luz (representadas por una flecha blanca con

contorno azul) no se movieron durante el tiempo que duró el ensayo. Las placas control incubadas a 23° C en oscuridad (flecha blanca con contorno negro) se movieron progresivamente hasta ocupar toda la placa.

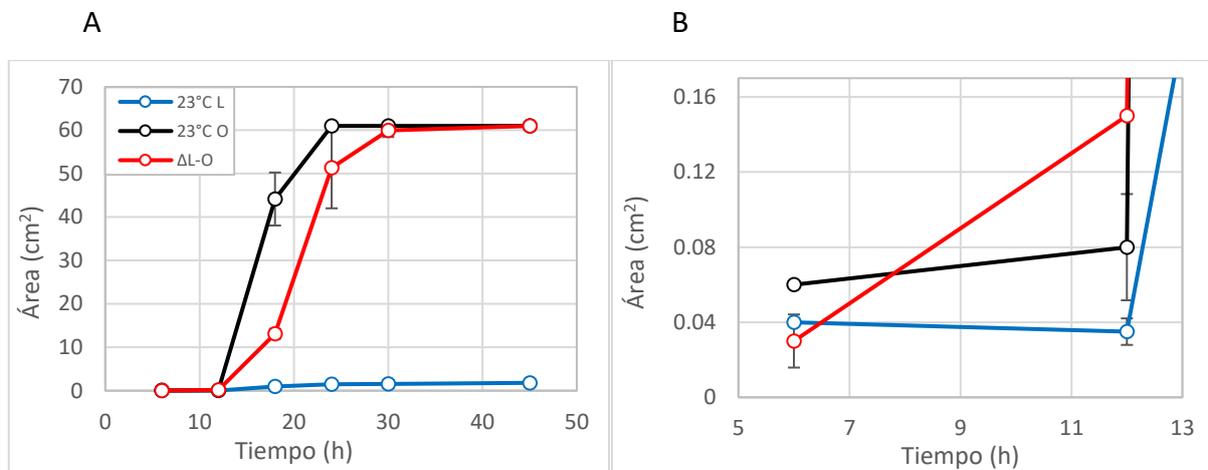


Figura 16. A) Esquema del ensayo de motilidad de *A. baumannii* ATCC 17978 expuesta a ciclos alternados de luz y oscuridad a 23° C (Δ L-O, en rojo) y sus controles en luz (azul) y en oscuridad (negro). B) Ampliación de la figura A para los tiempos comprendidos entre 5 y 13 horas.

Tal como se mencionó antes, hay varios factores que pueden estar influyendo en estas observaciones, tales como la fase de crecimiento de las bacterias, sumado al equilibrio entre la síntesis y degradación del ARN mensajero y de la proteína BIsA y su estabilidad a estas condiciones de iluminación cambiantes. También se demuestra con esto una reversibilidad en la fotorregulación de este fenotipo cuando se expone a las bacterias a un fotoperíodo, como debe ocurrir en la naturaleza, para que esta bacteria sea capaz de detectar, adaptarse y responder a las condiciones ambientales.

4.2.2.5. Discusión

La capacidad de BIsA de absorber energía y pasar del estado basal (bBIsA) al estado excitado (eBIsA) y volver al estado basal es una característica que se ha comprobado a 15° C y que ocurre en cuestión de segundos. Este fotociclo no se ha observado a 37° C, ya que bBIsA no fue capaz de absorber energía y pasar al estado excitado.

Estas observaciones se correlacionan con la temperatura crítica de transición de la fotorregulación de la motilidad a nivel fenotípico como al nivel de la expresión de *blsA* (mostrada en la sección 4.2.1). Específicamente, la capacidad de BIsA de realizar el fotociclo, la modulación de los niveles de expresión de *blsA* en función de la luz y la fotorregulación de

la motilidad de *A. baumannii* se dan a temperaturas menores a la temperatura crítica. En cambio, a temperaturas mayores que la crítica, BlsA no es capaz de realizar el fotociclo, los niveles de expresión de *blsA* son escasos o nulos y *A. baumannii* no es capaz de fotorregular la motilidad.

Todo esto indicaría que la capacidad de *A. baumannii* de revertir el fenotipo de motilidad en circunstancias cambiantes de luz y temperatura podría deberse a la capacidad de BlsA de realizar el fotociclo, como también a la expresión diferencial de *blsA*.

Es llamativo que en los tres experimentos realizados para probar la reversibilidad de la motilidad de *A. baumannii* en función de los cambios de temperatura o de iluminación, se repitió un patrón en el que en la segunda etapa en que se hubiera esperado que la bacteria detenga su movimiento, esto no ocurrió. La causa podría ser la fase de crecimiento en que las bacterias se encontraban en ese momento, no pudiendo adaptarse a este cambio de condiciones en esa etapa, pero si en las posteriores.

A modo de integración de los resultados presentados en las secciones 4.2.1 y 4.2.2, en nuestro grupo de trabajo se propuso un modelo que describe la situación de la proteína BlsA en función de la luz y la temperatura (Figura 4.17) [58]. En este modelo, se plantea que cuando *A. baumannii* se encuentra de forma estable a 24° C o menos (Figura 4.17a), es capaz de fotorregular diferentes aspectos de su fisiología. En este estado, las células cuentan con una población mínima de la proteína BlsA en presencia de luz azul y una población mucho mayor en oscuridad. La diferencia entre ambos estados, además de la concentración producto de la expresión diferencial, es la conformación. Los blancos de acción de BlsA son diferentes ya sea que esté en su estado excitado (eBlsA) o en su estado basal de energía (bBlsA), es decir, en luz o en oscuridad respectivamente. Si se produce un cambio repentino de temperatura, de modo que la bacteria pasa a estar a 37° C, se produce un cambio conformacional de BlsA tal que la mayor parte de la proteína libera al FAD, se agrega y precipita. Tanto en luz como en oscuridad, la fracción de BlsA que no se agrega y permanece en solución, mantiene unido al FAD, pero en una conformación tal que queda más expuesto al solvente lo que no le permite pasar al estado excitado (eBlsA), realizar el fotociclo y transmitir la señal lumínica (Figura 4.17b). Con el tiempo, es posible que se produzca una degradación de BlsA de manera que los niveles detectados de esta proteína a esta temperatura sean nulos o escasos. En esta situación, no hay fotorregulación de la motilidad, no solo debido a que hay muy poca proteína en condiciones de oscuridad y nada

en condiciones de luz, sino que además, lo poco que puede haber no posee la conformación adecuada en la nanocavidad del FAD como para tener un fotociclo operativo y transmitir la señal (Figura 4.17c). Si en este momento se produce un cambio repentino de temperatura que hace que la bacteria vuelva a 24° C o menos, la poca cantidad de BlsA que se encontraba en solución, con el FAD unido, cambia de conformación, volviéndose activa con la posibilidad de realizar el fotociclo, detectar la luz y transmitir la señal (Figura 4.17d). Así, probablemente comience la síntesis *de novo* de BlsA hasta alcanzarse niveles adecuados del ARN mensajero y de la proteína. De este modo la célula recupera la capacidad de detectar la luz a través de la absorción de la energía gracias a BlsA y el FAD unido en una conformación adecuada, transferir la energía, realizar un fotociclo y dar comienzo a la cascada de transducción de la señal lumínica que va a dar como resultado la fotorregulación de la motilidad y de otros aspectos de la fisiología de *A. baumannii*.

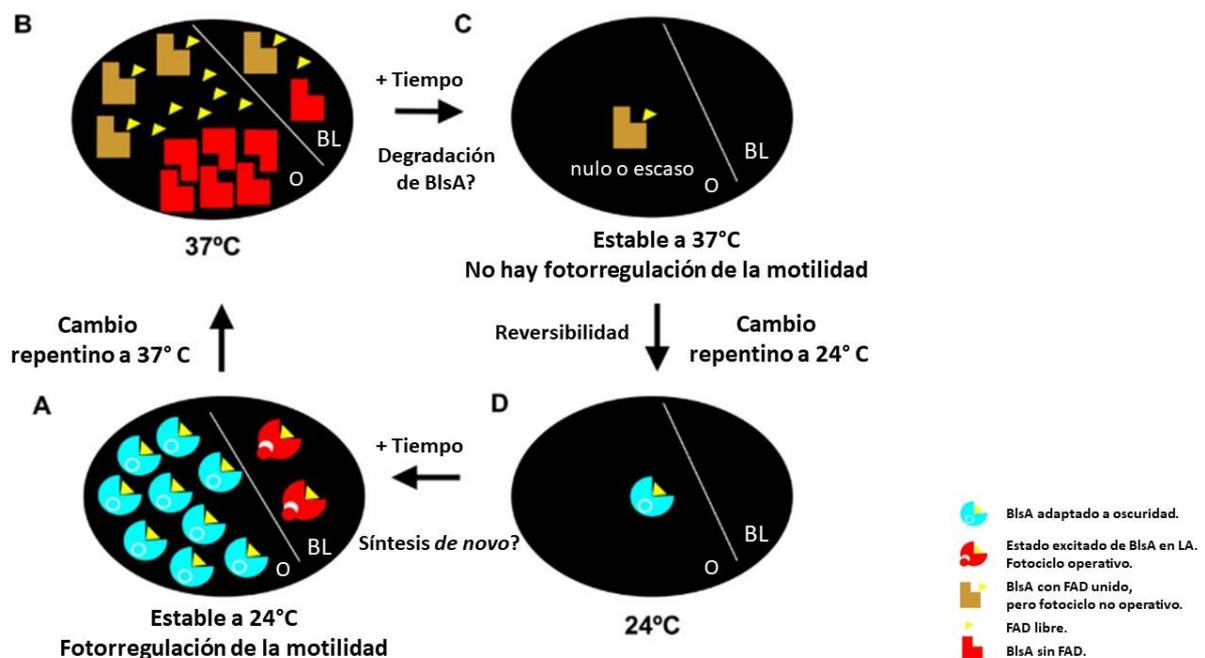


Figura 4.17. Modelo propuesto como explicación para la fotorregulación de la motilidad, desde el punto de vista de la cantidad de proteína BlsA presente, su estabilidad, la conformación y la capacidad de retener el cofactor FAD, en función de la temperatura, el tiempo y las condiciones de iluminación.

4.2.3. La luz regula la motilidad asimismo en otras especies de *Acinetobacter* de interés clínico.

4.2.3.1 La regulación por luz de la motilidad se reduce gradualmente con la temperatura en *Acinetobacter* sp. A47.

Acinetobacter sp. A47 ha sido recuperada de pacientes post quirúrgicos y los análisis de secuencia comparativos de los genes 16s ARN, *rpoB* y *gyrB* indican que dicha cepa corresponde una nueva especie del género *Acinetobacter*, cercana a *A. haemolyticus* [52], [53].

Con el fin de caracterizar esta cepa y determinar si es capaz de fotorregular la motilidad en función de la temperatura, se realizaron ensayos en los que se inoculó esta bacteria en el centro de placas de Petri conteniendo medio SA. Estas se incubaron posteriormente en luz o en oscuridad.

Los resultados indican que la luz inhibe la motilidad de la cepa A47, mientras que esta inhibición no ocurre en condiciones de oscuridad, por lo que A47 es capaz de fotorregular la motilidad. Dicha inhibición es total a 24° C, mientras que la inhibición de la motilidad se va reduciendo a medida que aumenta la temperatura (Figura 4.18).

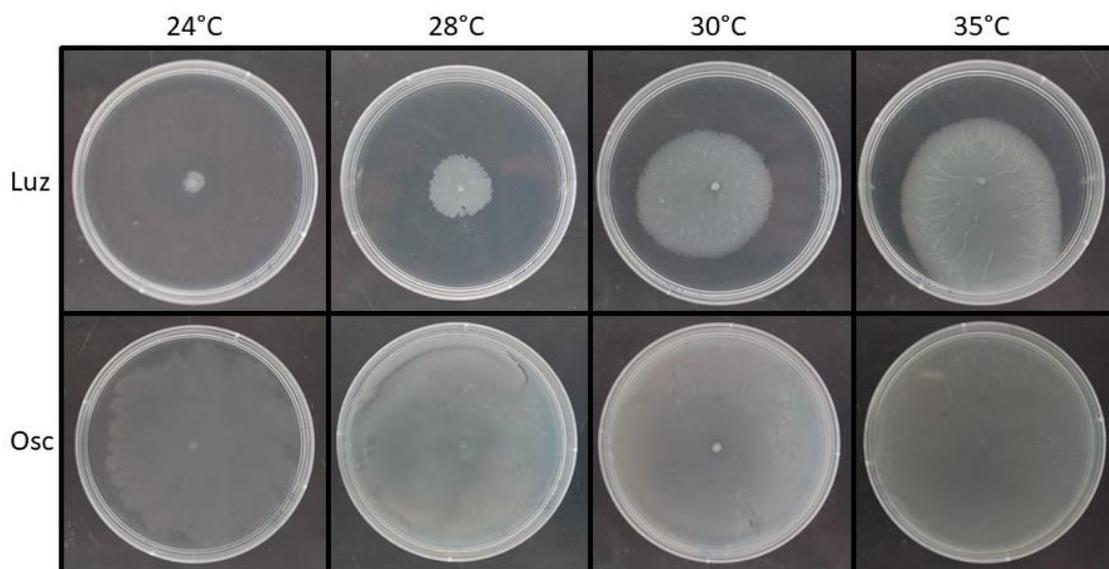


Figura 4.18. Ensayo representativo de la motilidad de la cepa A47 a distintas temperaturas en el rango de 24° C a 35° C y en condiciones de luz y oscuridad.

Es interesante notar que la inhibición por luz de la motilidad no solo es dependiente de la temperatura, sino que además es inversamente proporcional a esta (Figura 4.18).

Este resultado indica que la fotorregulación de la motilidad en esta cepa no es activada por un mecanismo del tipo “todo o nada”, sino que se produce de forma gradual.

Estudios *in silico* indican que la cepa A47 posee dos fotorreceptores putativos del tipo BLUF codificados en su genoma. Como se puede ver en la figura 4.19, uno de ellos (WP 038344067.1) es filogenéticamente más cercano al único fotorreceptor BLUF de *A. baumannii* ATCC 17978 que al otro fotorreceptor BLUF de la cepa A47 (WP 038344112.1).

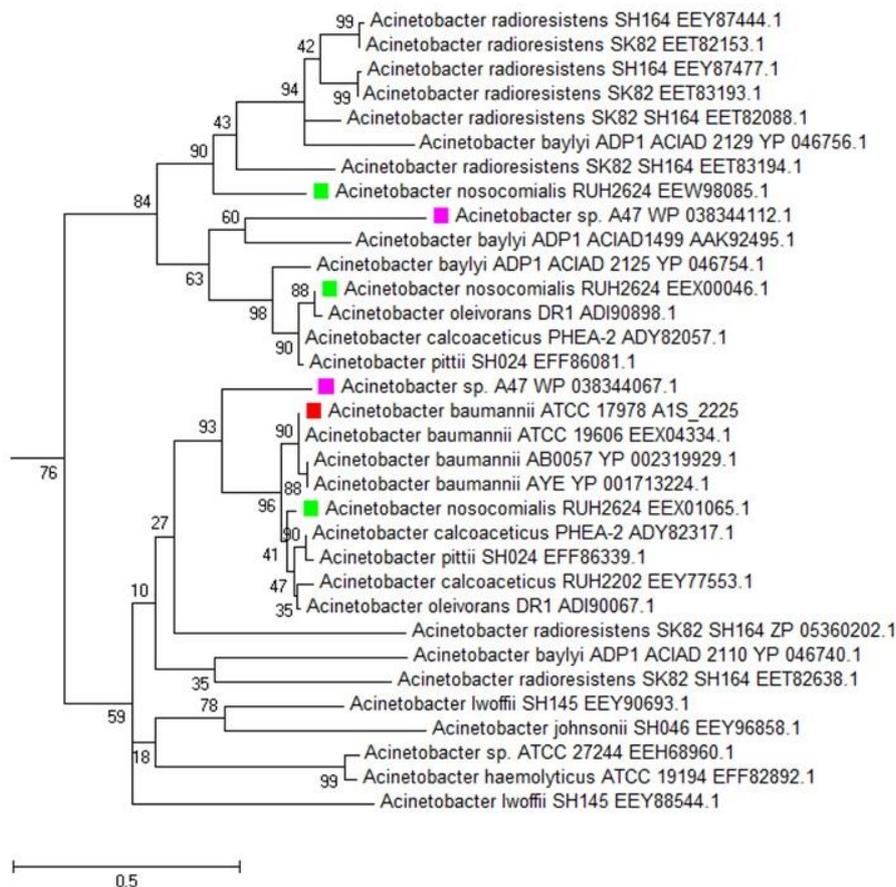


Figura 4.19. Árbol filogenético que muestra cómo agrupan los dominios BLUF de los distintos fotorreceptores del género *Acinetobacter*. En rojo se muestra el único BLUF de *A. baumannii* ATCC 17978. En violeta se muestran los 2 BLUF de *A. sp. A47*. En verde se muestran los 3 BLUF de *A. nosocomialis* RUH2624.

Estos resultados nos permiten ahondar en la fisiología y el comportamiento de esta importante especie clínica en diferentes circunstancias, con el objetivo último de contribuir a su control en ambientes nosocomiales y así evitar las infecciones producidas.

4.2.3.2. La regulación por luz de la motilidad se mantiene en un amplio rango de temperaturas en *A. nosocomialis* RUH2624.

Las especies *A. nosocomialis*, *A. calcoaceticus*, *A. baumannii* y *A. pittii* forman parte del complejo *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii* (ACB) [2]. *A. nosocomialis* es predominantemente aislada de pacientes hospitalizados [2], [68] y constituye asimismo un importante patógeno hospitalario.

Análisis de secuencias muestran que hay codificados tres fotorreceptores putativos del tipo BLUF en el genoma de este microorganismo, los cuales serían homólogos a BlsA de *A. baumannii*, si bien dos de ellos pertenecen a distintos grupos monofiléticos [23] y Figura 4.19).

Además, dicha cepa es capaz de fotorregular la motilidad y la formación de biofilms [23]. A diferencia de la cepa modelo de *A. baumannii* ATCC 17978, la fotorregulación de la motilidad ocurre no sólo a 24° C sino también a 37° C [23], observándose una intensidad similar a las distintas temperaturas intermedias (Figura 4.20). En particular, a las temperaturas ensayadas de 25° C, 26° C, 27° C, 32° C y 37° C se observa que en presencia de luz la motilidad se encuentra inhibida parcialmente, mientras que esto no ocurre en oscuridad.

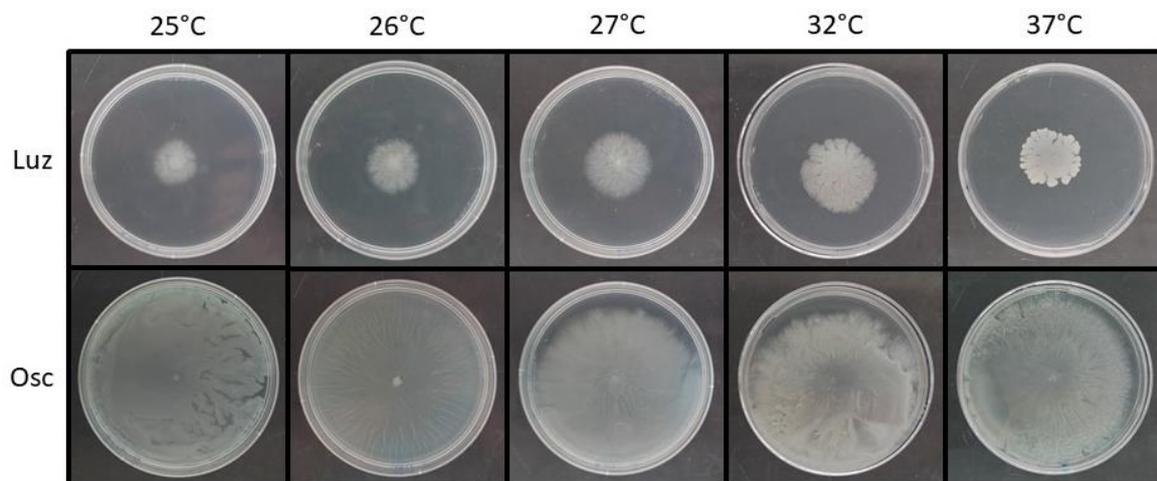


Figura 4.20. Ensayo representativo de la motilidad de la cepa *A. nosocomialis* RUH 2624 a distintas temperaturas en el rango de 25° C a 37° C y en condiciones de luz y oscuridad.

Es decir, que la luz inhibe la motilidad dentro del rango de 25° C a 37° C en la cepa *A. nosocomialis* RUH2624, mientras que en oscuridad la motilidad no es inhibida. Esto marca una diferencia con otras cepas y especies de *Acinetobacter*.

4.2.3.3. Discusión

En esta sección se estudiaron *A. nosocomialis* RUH 2624 y *A. sp.* A47. En comparación con *A. baumannii*, las tres son capaces de modular por luz la motilidad. Sin embargo, el modo en que lo hacen es diferente. Mientras que en *A. baumannii* la fotorregulación ocurre hasta temperaturas de 24° C, en A47 la fotorregulación es gradual durante todo el rango de temperaturas ensayadas y en *A. nosocomialis* la fotorregulación se mantiene constante en todo el rango de temperaturas ensayadas.

Estas diferencias pueden deberse a la dotación desigual de copias del gen *blsA* en cada una de las tres especies mencionadas como también a las diferencias estructurales y funcionales entre ellas. Mientras que *A. baumannii* posee un único gen de este tipo, A47 tiene 2 y *A. nosocomialis* tiene 3.

Además, se observó que los 3 genes tipo BLUF de *A. nosocomialis* pertenecen a distintos grupos monofiléticos, al igual que lo que ocurre con los 2 de A47. Así, se vio que uno de los de *A. nosocomialis* es más cercano al de *A. baumannii* y a uno de los de A47, el segundo de los de *A. nosocomialis* más cercano al segundo de A47 y el tercero de *A. nosocomialis* se ubica más lejano a todos los mencionados.

Es interesante notar que tanto la cepa *A. nosocomialis* como la A47 no solo son capaces de detectar las condiciones de iluminación a temperaturas bajas, sino que además lo hacen a altas temperaturas, compatibles con hospedadores de sangre caliente. Esta capacidad no solo hace que puedan integrar estos dos estímulos, para darle una noción más cabal del ambiente en el que se encuentran, sino que además indica que la luz podría tener influencia en las infecciones de estos microorganismos en humanos.

4.2.4. Expresión génica de *blsA* en *A. baumannii*.

4.2.4.1. La expresión de *blsA* aumenta en situación de hambreado severo.

Con el objetivo de determinar en qué condiciones fisiológicas de *A. baumannii* es necesaria la fotorregulación a través de BlsA, se estudiaron los niveles de expresión del gen *blsA* en diferentes situaciones utilizando la cepa ATCC 17978 de *A. baumannii*.

Así, efectuamos en primera instancia curvas de crecimiento en condiciones de medio líquido con agitación a 24° C (Figura 4.21) y a 37° C (Figura 4.22), en presencia de luz o en

oscuridad. Se observa que tanto las células que crecen en condiciones de luz azul, como aquellas en condiciones de oscuridad, presentan curvas de crecimiento normales y similares, indicando que la luz no afecta su crecimiento.

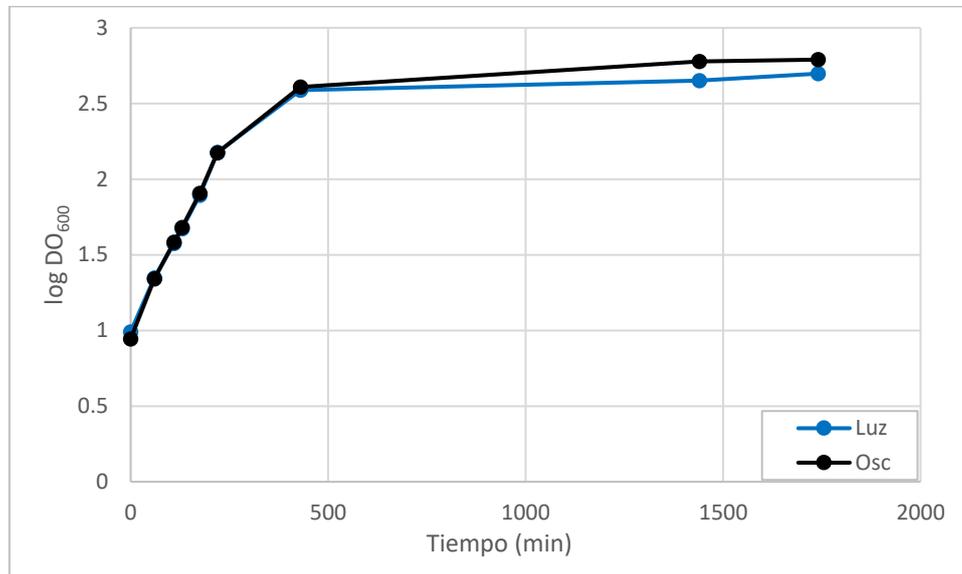


Figura 4.21. Curva de crecimiento de *A. baumannii* 17978 en cultivo líquido y en condiciones de luz (azul) y de oscuridad (negro) a 24° C.

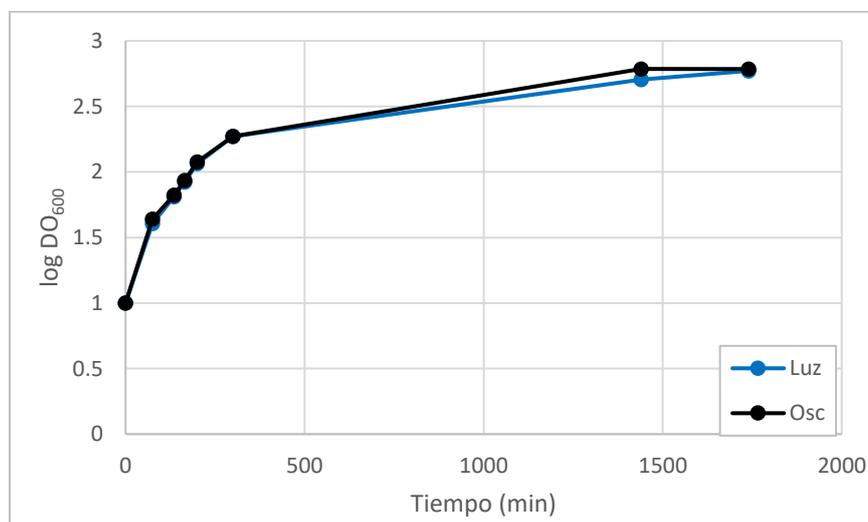


Figura 4.22. Curva de crecimiento de *A. baumannii* 17978 en cultivo líquido y en condiciones de luz (azul) y de oscuridad (negro) a 37° C.

Posteriormente se midieron los niveles de expresión de *bIsA* a partir de muestras tomadas de diferentes puntos de las curvas a ambas temperaturas.

Como se puede observar en la figura 4.23, los resultados indicaron que a 24° C los niveles del transcripto *bIsA* son mayores en oscuridad que en luz durante toda la fase

exponencial. Sin embargo, en la fase estacionaria, estos valores fueron notablemente mayores, especialmente en oscuridad. Por el contrario, a 37° C, los niveles de expresión de *blsA* fueron marcadamente menores que a 24° C tanto en fase exponencial como en fase estacionaria y similares entre luz y oscuridad.

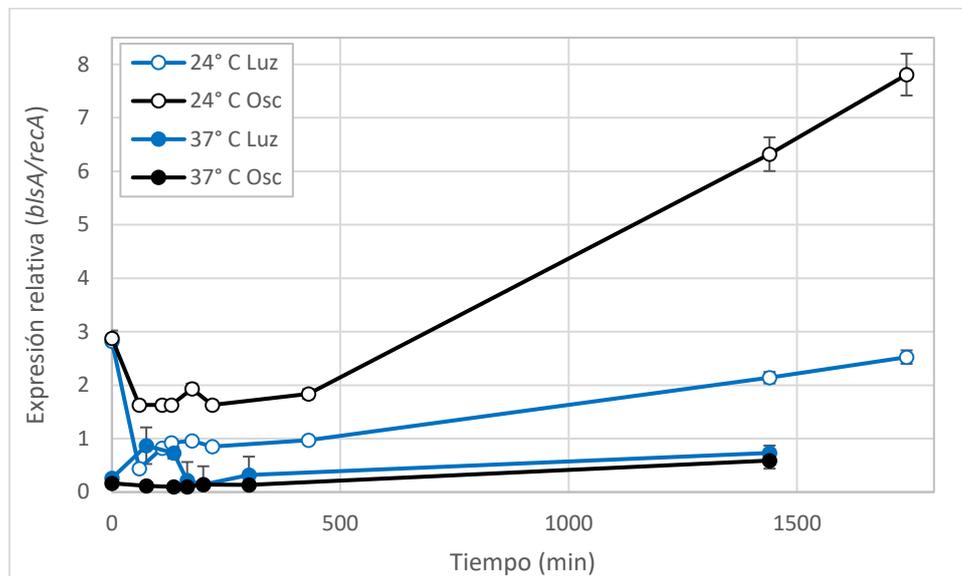


Figura 4.23. Expresión del gen *blsA* en cultivo líquido con agitación a 24° C (puntos blancos con contorno) y a 37° C (puntos rellenos), en luz (azul) y oscuridad (negro).

De todos los puntos analizados en estas curvas, se eligieron algunos correspondientes a la fase exponencial y estacionaria de crecimiento tanto en luz, como en oscuridad y a 24° C y se tomaron muestras para analizar los niveles del fotorreceptor BlsA en las células en estas condiciones.

En la figura 4.24 se puede ver que cuando se hizo un inmunoensayo sembrando 350µg de proteínas totales de cada una de las cuatro condiciones ensayadas aparecen bandas correspondientes a la proteína BlsA. En la calle sembrada con el control positivo, la banda se ubica más arriba, debido a que este control corresponde a la proteína BlsA recombinante con una fusión a una cola de poli-Histidina necesaria para su purificación.

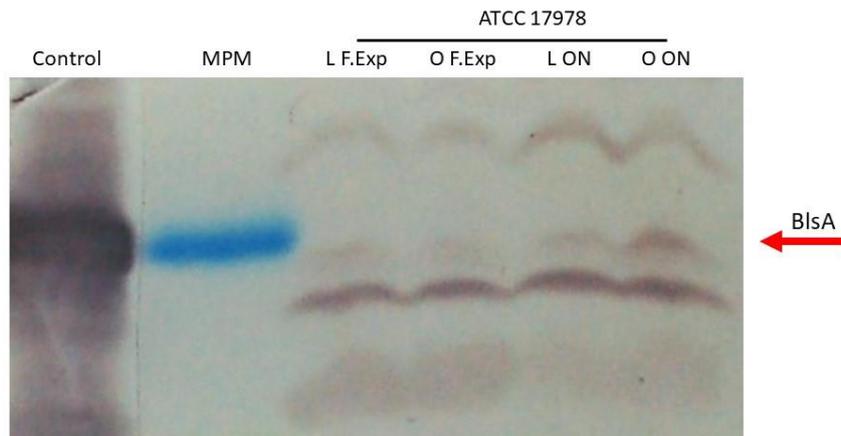


Figura 4.24. Inmunodetección de BlsA en muestras de *A. baumannii* ATCC 17978 provenientes de cultivo a 24° C, correspondientes a la fase exponencial de crecimiento (F.Exp), o fase estacionaria (ON) y en condiciones de luz (L) y de oscuridad (O). El tamaño de la banda del MPM es de 15kDa.

La banda correspondiente a BlsA que aparece en la alícuota extraída del cultivo en fase estacionaria y en condiciones de oscuridad (O ON) tiene una mayor intensidad que la que se observa en las alícuotas extraídas de los cultivos en fase estacionaria en presencia de luz (L ON), así como de la fase exponencial tanto en luz (L F.Exp) como en oscuridad (O F.Exp). Esto indicaría que hay una mayor expresión de la proteína BlsA en condiciones de oscuridad en fase estacionaria que en las otras 3 muestras analizadas.

Además, se hicieron otros inmunoensayos para detectar BlsA en extractos de proteínas totales de mutantes $\Delta blsA$ (que no expresa el fotorreceptor) (Figura 4.26), $\Delta blsA$ pWH1266-BlsA (Figura 4.25), la cual expresa una copia salvaje del gen *blsA* desde su propio promotor clonado desde el plásmido pWH1266 y la mutante $\Delta blsA$ conteniendo el vector vacío pWH1266 (Figura 4.26), como control. En todos los casos las alícuotas se tomaron en las mismas fases y condiciones que las alícuotas de la cepa salvaje que se muestran en la figura 4.24.

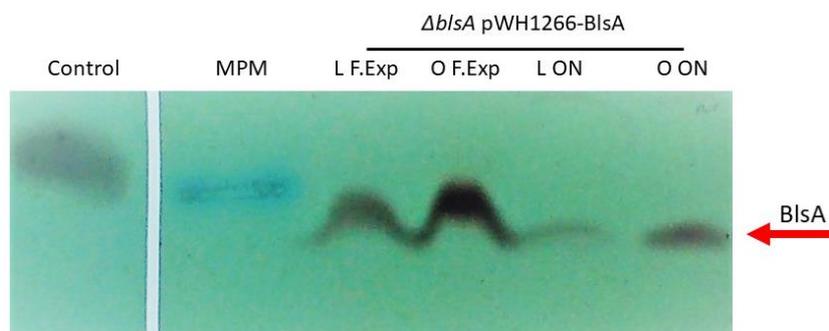


Figura 4.25. Inmunodetección de BlsA en muestras de mutantes en *blsA* que expresan una copia salvaje de BlsA desde su propio promotor en el plásmido pWH1266, provenientes de cultivo a 24° C, correspondientes a la fase exponencial de

crecimiento (F.Exp) y a la fase estacionaria (ON) y en condiciones de luz (L) y de oscuridad (O). El tamaño de la banda del MPM es de 15kDa.

De aquí se puede ver, tal como era de esperarse, que en las cuatro muestras se expresa el fotorreceptor BlsA. Es importante mencionar que en este caso estamos analizando un sistema que no es natural, al expresar la proteína en cuestión desde un plásmido, por lo que la dosis génica varía y pueden estar influyendo diferentes factores que no necesariamente intervienen en las condiciones presentes en las células salvajes. Sin embargo, se puede observar que tanto para la fase exponencial como para la estacionaria, las bandas correspondientes a las condiciones de incubación en oscuridad son de mayor intensidad que las de luz. Esto indica que al igual que en las células salvajes se da la fotorregulación de la expresión de BlsA.

Los inmunoensayos realizados a partir de las proteínas totales extraídas de la mutante $\Delta blsA$ y $\Delta blsA$ -pWH1266, no presentan bandas a la altura correspondiente al fotorreceptor, como era de esperarse, ya que ninguna de las dos cepas es capaz de sintetizar BlsA (Figura 4.26).



Figura 4.26. Inmunodetección de la proteína BlsA en muestras correspondientes a la cepa mutante en el fotorreceptor $\Delta blsA$, la cual no lo expresa, así como la mutante transformada con el plásmido vacío utilizada como control, provenientes de cultivo crecido a 24° C hasta fase exponencial (F.Exp) y fase estacionaria (ON) y en condiciones de luz (L) y de oscuridad (O). El tamaño de la banda del MPM es de 15kDa.

4.2.4.2. Los niveles del ARNm de *blsA*, disminuyen al pasar de 24°C a 37°C en un cultivo en oscuridad.

Se ha mostrado en la figura 4.23 que la expresión de *blsA* en células creciendo en cultivo líquido es mayor en oscuridad que en luz a 24° C y que los niveles de expresión a 37° C son todavía menores. Con el objetivo de evaluar los cambios en los niveles de expresión de *blsA* frente a cambios de condiciones de temperatura en cultivo líquido, se crecieron las bacterias en oscuridad hasta fase exponencial, de tal manera que las células se encontraran

adaptadas al crecimiento a esa temperatura. A continuación, el cultivo se cambió súbitamente a 37° C. Luego, se recuperaron células a distintos tiempos, se extrajo ARN y se efectuaron determinaciones de los niveles de *blsA* por RT-qPCR (Figura 4.27).

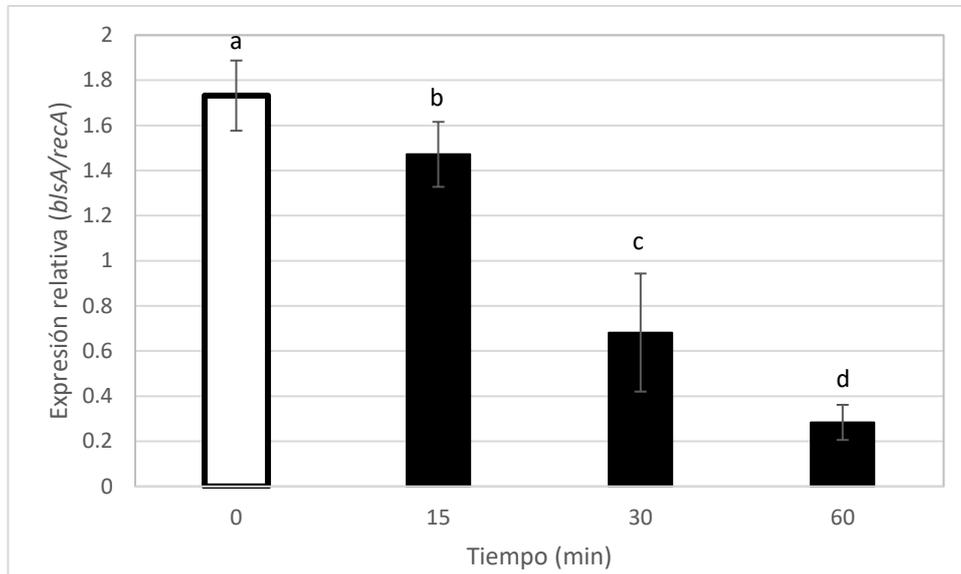


Figura 4.27. Niveles de expresión relativa de *blsA* a distintos tiempos frente a un cambio de temperatura del medio de cultivo de 24° C a 37° C. Las distintas letras indican valores estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

Estos resultados indican que los niveles del ARN mensajero de *blsA* en condiciones de oscuridad disminuyen progresivamente con el tiempo al pasar de 24° C a 37° C, en cortos períodos de tiempo, reduciéndose en un 84% a los 60 minutos. Esto concuerda con lo observado para los ensayos en cultivo líquido (Figura 4.23) y de motilidad (Figura 4.3), donde para este último caso se vio que los niveles de *blsA* son significativamente menores a temperaturas superiores a la temperatura crítica de transición de la fotorregulación (24° C – 25° C).

Esta disminución en la expresión de los niveles de *blsA* en función del tiempo a 37° C, observada en cultivo incubado en condiciones de oscuridad, puede ser consecuencia de la reducción en la estabilidad del ARNm, sumado a la reducción o ausencia de síntesis *de novo* del ARNm.

4.2.4.3. Los niveles del ARNm de *blsA* disminuyen al pasar de oscuridad a luz azul en un cultivo a 24° C.

Luego, se crecieron las bacterias en oscuridad hasta fase exponencial, de tal manera que las células se encontraran adaptadas al crecimiento a esas condiciones. A continuación,

el cultivo se cambió súbitamente a condiciones de luz azul y se recuperaron células a distintos tiempos, se extrajo ARN y se efectuaron determinaciones de los niveles de *blsA* por RT-qPCR (Figura 4.28).

En este caso, se observa que la expresión relativa del gen *blsA* disminuye progresivamente con el tiempo alcanzando niveles a los 240 minutos de aproximadamente el 15% del valor al tiempo 0 (Figura 4.28).

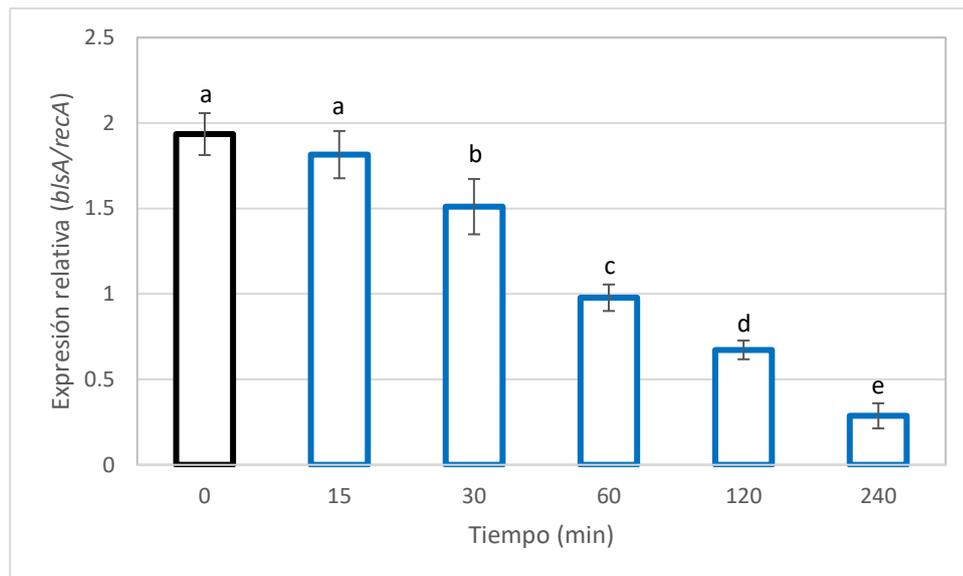


Figura 4.28. Niveles de expresión relativa de *blsA* a 24° C, en función del tiempo y frente a un cambio de condiciones de iluminación, al pasar de oscuridad a luz azul. Las distintas letras indican valores estadísticamente diferentes.

Esto es congruente con resultados anteriores en los que se observa que los niveles de *blsA* son mayores en cultivos adaptados a oscuridad respecto de cultivos adaptados a luz [12], [58]; Figura 4.23).

4.2.4.4. Discusión.

Se ha reportado que *Acinetobacter baumannii* es capaz de subsistir en diversos ambientes y condiciones, especialmente el ámbito hospitalario [69], [70]. Para poder persistir y tener una ventaja competitiva frente a otros organismos, es necesario que entre otras características cuente con una gran plasticidad para adaptarse a las diversas condiciones y responder adecuadamente.

En esta sección se vio que cuando *A. baumannii* se encuentra en cultivo líquido a 24° C no solo es capaz de modular los niveles de expresión de *blsA* en función de la luz, sino que en condiciones de hambre severo, las diferencias se hacen mucho más importantes.

Este hallazgo puede indicar que ante la falta de nutrientes, la detección de la luz juega un papel fundamental para la subsistencia de *A. baumannii*, probablemente indicando a la bacteria que debe disparar ciertos mecanismos que le permitan subsistir o incluso escapar hasta que vuelva a encontrar un ambiente favorable.

En relación a esto, en cultivo líquido y en placas de motilidad, a 24° C o menos y en condiciones de luz, las bacterias responden de la misma manera, es decir, activando la expresión del gen *blsA*. Esto podría indicar que la estrategia por la que *A. baumannii* se mueve por la superficie de la placa en las condiciones mencionadas se deba a una actitud nómada para escapar de las zonas de las que va consumiendo los nutrientes, hacia otras donde todavía estén disponibles.

Por otro lado, también se vio que *A. baumannii* es capaz de modular la expresión de *blsA* ante los cambios repentinos de condiciones de luz y temperatura. Esta capacidad para responder rápidamente también le conferiría una ventaja competitiva con otros organismos con los que comparte los diversos nichos. El descenso gradual de los niveles de *blsA* detectados en los dos cambios de condiciones ensayados puede deberse a la degradación progresiva del ARNm presente en la condición de partida.

Cuando se ensayó la capacidad de expresar el gen *blsA* en cultivo líquido en función de cambios de temperatura y de condiciones de iluminación a tiempos cortos, la respuesta fue una disminución gradual de los niveles del ARN mensajero. Este descenso paulatino podría deberse a un equilibrio entre la velocidad de degradación del ARN mensajero proveniente de las condiciones iniciales y de la disminución de la tasa de transcripción de *blsA*.

4.3. Conclusiones.

El conjunto de datos presentado en el presente capítulo nos permite sacar las siguientes conclusiones:

Existe una temperatura crítica de transición a partir de la cual se pierde la regulación por luz de la motilidad. Esto se correlaciona con una regulación de la expresión del fotorreceptor BlsA, tanto a nivel del ARN mensajero, como de los niveles de la proteína en la célula.

La dependencia de la fotorregulación de la motilidad con la temperatura se da también al nivel de la fotoquímica de BlsA, lo cual es un modo mucho más rápido de respuesta que la síntesis o degradación ya sea del ARN mensajero o de la proteína.

La fotoactividad de BlsA está gobernada por cambios conformacionales de la proteína dependientes de la temperatura que producen una fuerte reducción de la eficiencia de la fotoactivación y agregación proteica a temperaturas elevadas.

BlsA es un fotorreceptor que controla la respuesta a la luz a temperaturas bajas a moderadas y su regulación se da a dos niveles: expresión y fotoactividad.

La capacidad de realizar el fotociclo y los rápidos cambios conformacionales que es capaz de sufrir BlsA, funcionan como una primera línea de control y como un sistema mucho más rápido para la detección de cambios repentinos de condiciones. La adaptación a las nuevas condiciones es un proceso rápido, que lleva minutos.

Acinetobacter baumannii es capaz de revertir la motilidad en función de los cambios de temperatura y de condiciones de iluminación.

A. nosocomialis y *A. sp. A47* son capaces de modular por luz la motilidad en el rango de temperaturas ensayadas.

A. baumannii, *A. nosocomialis* y *A47* poseen una dotación desigual de fotorreceptores tipo BLUF codificados en su genoma.

Estos diferentes fotorreceptores podrían ser los responsables de las diferentes características de la regulación de la motilidad entre las 3 especies de *Acinetobacter*.

La expresión de *blsA* en cultivo líquido y a 24° C aumenta considerablemente en condiciones de hambreado severo.

Los niveles de ARN mensajero de *blsA* se modulan frente al cambio de condiciones de iluminación y de temperatura.

*Transducción de la señal
lumínica en A.
baumannii*

5. Transducción de la señal lumínica en *A. baumannii*.

5.1. Introducción

En nuestro grupo de trabajo hemos avanzado considerablemente en la caracterización de los procesos modulados por luz en *A. baumannii*. En este capítulo se muestran avances en la dilucidación del mecanismo de transducción de la señal.

Se ha reportado que algunos compuestos que contienen el nucleótido guanina funcionan como mensajeros secundarios en bacterias, cumpliendo el rol de efectores en diferentes sistemas de transducción de la señal [46], [71].

En particular, el diguanilato cíclico o c-di-GMP (del inglés *cyclic-di-guanosine monophosphate*), es un mensajero secundario muy importante y común entre las bacterias, ya que controla una gran cantidad de funciones tales como motilidad, virulencia, agregación y formación de biofilms, muchas de las cuales son fundamentales para la interacción con organismos eucariotas [71]. En general, elevados niveles de c-di-GMP promueven la transición de un modo de vida móvil e individual a otro sésil y colectivo [71]–[76].

El c-di-GMP se sintetiza gracias a la acción de la enzima diguanilato ciclasa (DGC), que condensa dos moléculas de GTP y se caracteriza por tener un motivo GGDEF (Glicina-Glicina-Aspartato-Glutamato-Fenilalanina) o GGEEF (Glicina-Glicina-Glutamato-Glutamato-Fenilalanina). En contrapartida, es degradado por fosfodiesterasas (PDE), que pueden presentar un motivo EAL (Glutamato-Alanina-Leucina) o bien HD-GYP (Histidina-Aspartato y Glicina-Tirosina-Prolina) [71]. Estas enzimas a su vez suelen estar asociadas a dominios sensores que detectan señales intra y extracelulares, por lo que los niveles de c-di-GMP dependen de las condiciones en las que se encuentra la célula y del equilibrio entre las actividades de la DGC y PDE [72].

Se ha demostrado que el c-di-GMP inhibe la motilidad tipo swimming dependiente de flagelo y tipo twitching dependiente de *pili* tipo IV [77] en varias bacterias [78] tales como *Escherichia coli* [79]–[81], *Pseudomonas aeruginosa* PA14 [82], *Lysobacter enzymoenes* [83] *Rhizobium etli*, *Rhizobium leguminosarum*, *Pseudomonas savastanoi* y *Pseudomonas syringae* [75].

Además, se ha demostrado que el c-di-GMP estimula la producción de biofilms en *Bordetella bronchiseptica* [84], *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* [85], [86], *Shewanella oneidensis* [87], *Vibrio vulnificus* [88], *Pectobacterium atrosepticum* [89], *Sinorhizobium meliloti* [90] y en diferentes rizobios y patovares del complejo *Pseudomonas syringae* [75].

Dado que *Acinetobacter baumannii* fotorregula la motilidad y la formación de biofilms (Mussi 2010, Golic 2013 y en el capítulo 4 de la presente tesis), se propuso estudiar si este compuesto podría estar involucrado en la señalización por luz de *A. baumannii*.

En este capítulo, se analizó además otro posible actor en la transducción de la señal lumínica en *A. baumannii*, como es una proteína con dominio BOF (Binding of Oligosaccharide Fold) muy próxima en el contexto genómico a *blsA*.

El análisis *in silico* del entorno génico de *blsA* en *A. baumannii* ATCC 17978, reveló la presencia de un gen corriente arriba, que está muy cercano y codificado en el mismo sentido (Figura 5.1). Este gen codificaría para una proteína putativa con dominio BOF y debido a su proximidad y orientación, podría estar involucrado en la cascada de transducción de la señal lumínica, iniciada por la proteína BlsA.

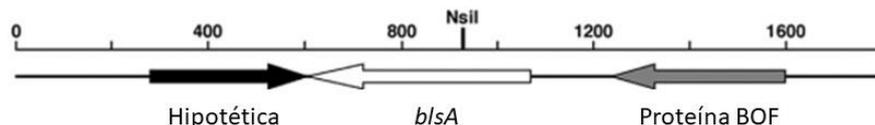


Figura 5.1. Entorno génico de *blsA*, donde se muestra la presencia, proximidad y sentido en el que está codificado un gen presentando dominio BOF.

La familia de proteínas conteniendo dominios BOF presenta gran diversidad en secuencia y función. A algunas de ellas se les ha reconocido la capacidad de unión a ADN doble hebra [91] y simple hebra [92]–[94], ARN mensajero [95], [96], ARN de transferencia [97]–[100] ensamblado de complejos proteicos y regulación de interacciones proteína-proteína [91], [97], [101], así como la unión a oligosacáridos [102].

La presencia de una proteína putativa con dominio BOF en las inmediaciones del gen que codifica para el fotorreceptor BlsA, con una gran variedad potencial de blancos de acción, proponen a esta proteína como un candidato interesante para la transducción de la señal.

5.2. Resultados y discusión.

5.2.1. Participación del c-di-GMP en la transducción de la señal lumínica en *A. baumannii*.

5.2.1.1. Búsqueda *in silico* de DGCs y PDEs en el genoma de *A. baumannii* ATCC 17978.

Se evaluó la presencia de DGCs y PDEs putativas en el genoma de *A. baumannii* como posibilidad de que el c-di-GMP se sintetice y se degrade en esta bacteria y por consiguiente que pueda funcionar como mensajero secundario. Con el objetivo de identificar DGCs y PDEs putativas se realizó una comparación de secuencias *in silico* utilizando como molde la DGC PleD de *Caulobacter crescentus*.

Se identificaron de esta manera 5 DGCs putativas, de las cuales 2 presentan un motivo GGDEF (A1S_2986 y A1S_3296), mientras que las otras 3 tienen un motivo GGEEF (A1S_0751, A1S_1067, A1S_1695). También se identificaron 3 proteínas putativas que contienen los motivos GGDEF y EAL (A1S_0546, A1S_1949 y A1S_2506) y 1 proteína putativa con los motivos GGEEF y EAL (A1S_3345), lo que indicaría que podrían ser proteínas con actividad dual DGC y PDE. Por último, se identificaron 2 PDE putativas de las cuales una de ellas (A1S_2337) contiene un motivo EAL, mientras que la otra (A1S_2666) carece de los motivos característicos EAL o HD-GYP (por lo tanto no se incluyó en la tabla), lo que sugeriría que podría ser un regulador de respuesta que une c-di-GMP pero que no presentaría actividad enzimática (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Región proteica flanqueante a los motivos GG(D/E)EF y/o EAL de las diferentes DGCs y PDEs putativas de *A. baumannii* ATCC 17978 y PleD de *Caulobacter crescentus* y sus respectivos locus genéticos.

Locus	Secuencia						
A1S_2986	H Q D F I A R L	G G D E F	A V I L H S I T				
A1S_3296	A S D L I V R Y	G G D E F	L I L L E - Q V				
A1S_0751	P H D L L G R F	G G E E F	A I F I P - D T				
A1S_1067	H V D F V A R Y	G G E E F	V V L L P - E T				
A1S_1695	S G D L V A R Y	G G E E F	L L L F P - M T				
A1S_0546	E K C K L L R I	G G D E F	L L I A E - N T	I C G V	E A L	I R W N	
A1S_1949	E R C S V A R L	G G D E F	A V I V S H L E	V V G F	E A L	L R W H	
A1S_2506	T A Y T A S R I	G G D E F	V I L M P - G A	I H E L	E A L	W N G K	
A1S_3345	N E D I I G R F	G G E E F	I L L L P - H T	N T H L	E A L	H E Q Q	
A1S_2337				I K G F	E A L	I R W Q	

PleD | A I D L P C R F **G G E E F** V V I M P E T S | G D T P **E A L** L K R A |

Las secuencias proteicas de estas DGCs y PDEs putativas se compararon con los genes que se expresan diferencialmente en función de la luz obtenidos a partir de un estudio de transcriptómica por RNA-seq realizado sobre la cepa ATCC 19606 crecida en microplacas con LB líquido y sin agitación [103].

Los resultados indican que en la cepa ATCC 19606 no hay ninguna proteína homóloga a estas DGCs o PDEs en la cepa ATCC 17978, que se modulan por luz (Tabla S1 en [103]).

5.2.1.2. El c-di-GMP no altera la modulación por luz de la motilidad en *A. baumannii*.

Para probar el efecto del posible mensajero secundario c-di-GMP en la motilidad de la cepa salvaje ATCC 17978 y la mutante isogénica en el fotorreceptor (Δ blsA), se efectuaron ensayos de motilidad a 24° C agregándose este compuesto al medio de cultivo. A modo de control, se utilizaron los compuestos guanosina monofosfato o GMP (por sus siglas en inglés *guanosine mono phosphate*), GMP cíclico (GMPc) y 8-Br-GMP (análogo al GMPc).

En las Figuras 5.2 y 5.3 se puede ver que la luz inhibió la motilidad de la cepa ATCC 17978 a 24° C frente al agregado de cada uno de los compuestos de guanina ensayados, así como también para la placa de motilidad utilizada como control, sin compuestos (s/c) agregados. En cambio, en condiciones de oscuridad, la motilidad no se vio inhibida, sino que la cepa salvaje se movió ocupando toda la superficie del medio SA, tanto frente al agregado de los diferentes compuestos de guanina ensayados, como para el control (Figuras 5.2 y 5.3). En el caso de la cepa mutante en el fotorreceptor Δ blsA, se observó que, tanto en condiciones de luz como de oscuridad, las bacterias se movieron ocupando toda la superficie de la placa, tanto en las que fueron suplementadas con los compuestos de guanina en sus diferentes formas como en las que no (Figuras 5.2 y 5.3).

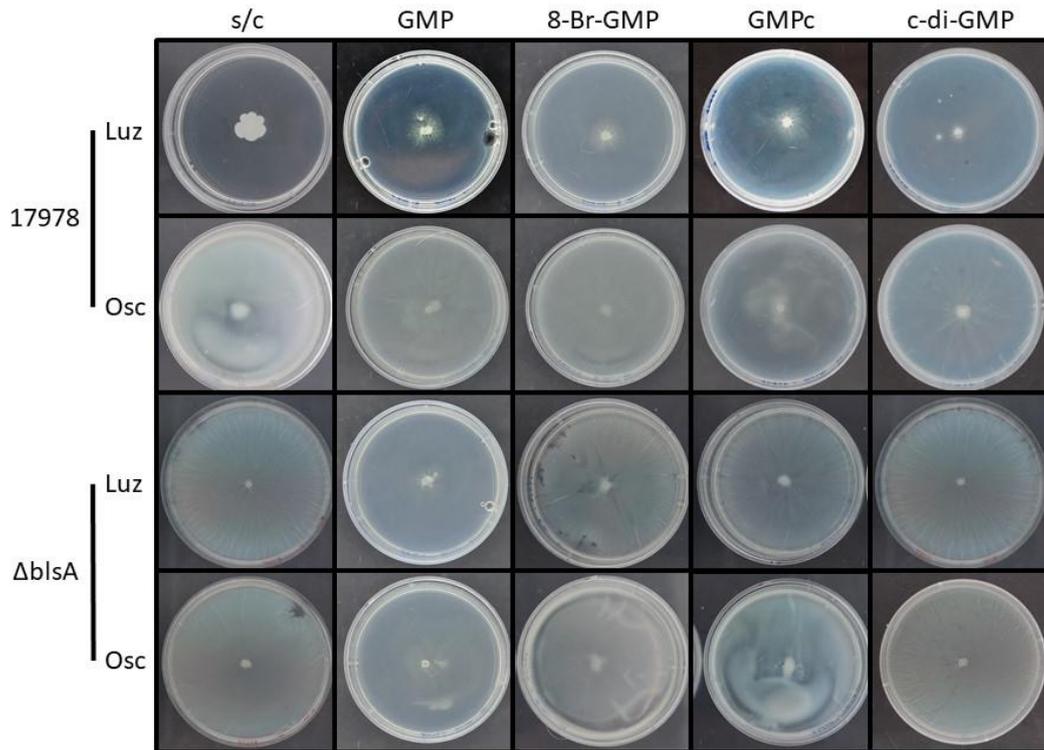


Figura 5.2. Ensayo representativo de la motilidad a 24° C para *A. baumannii* ATCC 17978 salvaje y su mutante isogénica en el fotorreceptor ($\Delta blsA$), en condiciones de luz y oscuridad con el agregado o no (s/c) de diferentes compuestos de guanina.

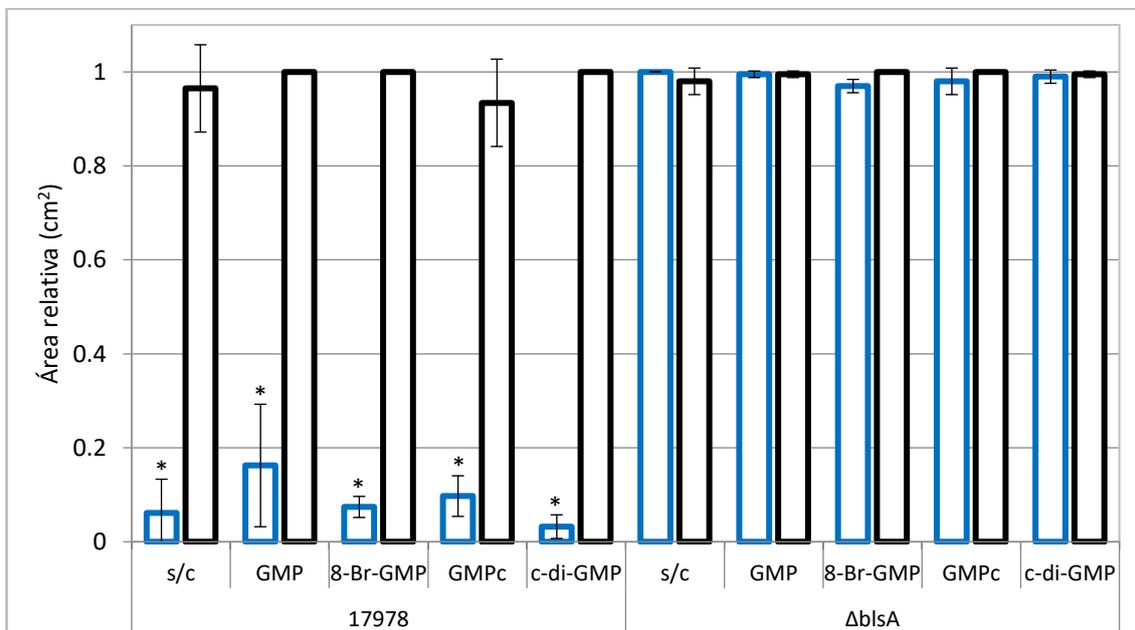


Figura 5.3. Cuantificación del área de motilidad de *A. baumannii* ATCC 17978 y su mutante isogénica en el fotorreceptor ($\Delta blsA$) frente al agregado de los diferentes compuestos de guanina en el medio de cultivo. Las barras blancas con contorno azul indican incubación en luz azul a 24° C. Las barras blancas con contorno negro indican incubación en oscuridad a 24° C. Los asteriscos indican valores estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

Es decir que el agregado de cada uno de estos compuestos no produjo diferencias significativas en la motilidad de la cepa salvaje, ni de la mutante Δ blsA, ni en luz ni en oscuridad, respecto del control sin compuestos (s/c) agregados.

Estos resultados sugieren que ninguno de todos los compuestos de guanina y especialmente el c-di-GMP, evaluado como posible mensajero secundario, tiene efecto sobre la fotorregulación de la motilidad de la cepa salvaje ni de la mutante en el fotorreceptor al ser agregados al medio de cultivo a 24° C.

5.2.1.3. El c-di-GMP modula la producción de biofilms en *A. baumannii*.

A fin de determinar si los compuestos de guanina podrían actuar en la cadena de transducción de la señal lumínica para la modulación de biofilms, se ensayó la capacidad de la cepa salvaje ATCC 17978 de *A. baumannii* y de la mutante Δ blsA de producir biofilms frente al agregado al medio de cultivo de estos compuestos.

En la Figura 5.4, se observa que en presencia de los compuestos GMP, 8-Br-GMP y GMPc los niveles de biofilms producidos en condiciones de luz fueron escasos o nulos, mientras que en condiciones de oscuridad fueron significativamente más elevados. Esto mismo se observó para el control, en el que la cepa salvaje se incubó sin agregar ningún compuesto al medio de cultivo (s/c), manifestándose la fotorregulación de la producción de biofilms. En cambio, frente al agregado del c-di-GMP, los niveles de biofilms producidos en luz y en oscuridad fueron escasos en ambas condiciones y comparables entre sí, perdiéndose la fotorregulación (Figura 5.4).

En el caso de la mutante Δ blsA, se vió que frente al agregado de GMP, 8-Br-GMP y GMPc se produjo biofilms tanto en condiciones de luz, como en oscuridad. Los niveles producidos fueron similares entre estas condiciones y comparables al control, en el que no se adicionó ningún compuesto al medio de cultivo, evidenciándose la ausencia de fotorregulación. En cambio, cuando se adicionó c-di-GMP, se observó que, aunque la falta de fotorregulación persiste, se produjo una disminución considerable de los niveles de biofilms en ambas condiciones de iluminación. Los niveles de biofilms producidos frente al agregado del c-di-GMP fueron similares a los observados en condiciones de iluminación para la cepa salvaje (Figura 5.4).

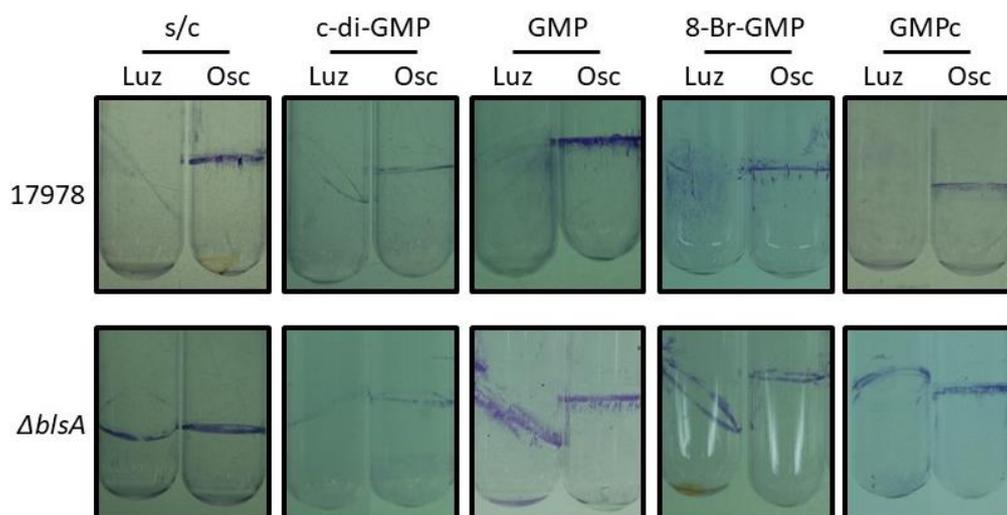


Figura 5.4. Ensayo representativo de producción de biofilms para las cepas de *A. baumannii* ATCC 17978 salvaje y la mutante isogénica en el fotorreceptor ($\Delta blsA$), frente al agregado de los diferentes compuestos conteniendo el nucleótido de guanina.

A partir de estos resultados se pudo observar que de todos los compuestos de guanina ensayados el c-di-GMP es el único que tiene efecto en la modulación de la formación de biofilms, específicamente, reduciendo los niveles producidos. Además, el agregado de c-di-GMP al medio de cultivo de la mutante $\Delta blsA$, tanto en luz como en oscuridad, mostró un comportamiento similar a la cepa salvaje en luz. Esto sugiere que la presencia de BlsA podría modular los niveles de c-di-GMP, reduciendo de esta manera la producción de biofilms en luz.

5.2.1.4. Discusión.

Se propone abajo un modelo que podría explicar los resultados mostrados en esta sección respecto de la participación del c-di-GMP en la transducción de la señal lumínica que lleva a la formación de biofilms en *A. baumannii* (Figura 5.5).

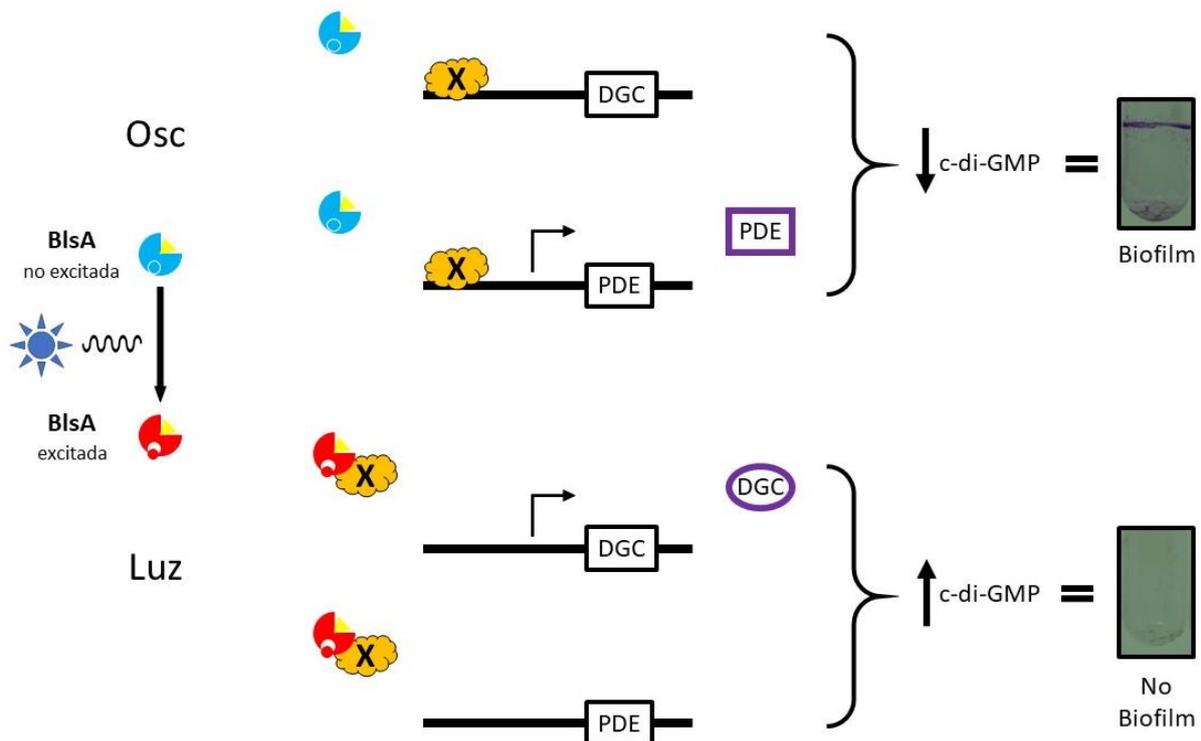


Figura 5.5. Modelo propuesto para la modulación de la formación de biofilms mediado por c-di-GMP a 24° C. En oscuridad, la molécula X se uniría a la región operadora del gen que codifica por una DGC, reprimiendo su transcripción en oscuridad y/o a la región promotora de una PDE activando su transcripción, resultando en cualquiera de los casos en la disminución de los niveles de c-di-GMP y estimulando la producción de biofilms. En presencia de luz, BlsA antagoniza con la molécula X impidiendo que se una al ADN, por lo que los niveles de c-di-GMP aumentan y no se producen biofilms.

En este modelo, se propone que la molécula X podría ser un regulador transcripcional, en analogía con dos mecanismos descritos por nuestro grupo de trabajo [104] (Tuttobene y col., en revisión) para la transducción de la señal de otros procesos celulares, o bien un regulador post-transcripcional.

En uno de los mecanismos mencionados, se vio que en condiciones de oscuridad, BlsA se une y antagoniza el funcionamiento de Fur en oscuridad, el cual es un represor de la transcripción de los genes que codifican para el sideróforo Acinetobactina (Tuttobene et al., 2018). En cambio, en el otro mecanismo BlsA se une y antagoniza el funcionamiento de AcoN en luz, el cual es un represor de la transcripción de los genes que codifican para el catabolismo de la acetoína (Tuttobene y col., en revisión).

Entonces, en este modelo se propone que a 24° C y en condiciones de oscuridad la molécula X podría ser un represor de genes que codifican por DGC o bien inductor de genes que codifican por PDEs, reprimiendo o induciendo la expresión génica según el caso. Como resultado, podría haber un contenido mayor de PDEs que de DGCs y por lo tanto los niveles

de c-di-GMP serían bajos y se producirían biofilms. Cuando la bacteria se encuentra en condiciones de luz, BlsA podría unirse y antagonizar el funcionamiento de la molécula X, por lo que se reduciría significativamente su capacidad de unirse a cualquiera de las dos regiones del ADN mencionadas. Como resultado, se podría activar la transcripción de la DGC en cuestión y/o no se induciría la transcripción de la PDE. Como resultado, la concentración de c-di-GMP aumentaría, inhibiéndose la producción de biofilms.

Según este modelo, cuando se incubaba a la bacteria salvaje a 24° C en presencia de luz azul, los niveles de c-di-GMP serían altos y por consiguiente los niveles de biofilms producidos serían nulos o escasos. Así, cuando se agregó este compuesto al medio de cultivo, no se produjo ningún cambio (Figura 5.4), mientras que en oscuridad, los niveles de c-di-GMP serían bajos y se formarían biofilms, pero el agregado exógeno de c-di-GMP haría que se produzca poco o nada (Figura 5.4).

En el caso de la mutante $\Delta blsA$, la ausencia del fotorreceptor resulta en la imposibilidad de que se antagonice el funcionamiento del compuesto X, por lo que los niveles de c-di-GMP tanto en luz como en oscuridad serían siempre bajos y se producirían biofilms. Al agregar el c-di-GMP de forma exógena, se elevarían los niveles de este mensajero secundario y por consiguiente los niveles de biofilm producidos serían nulos o escasos (Figura 5.4).

Pseudomonas aeruginosa PA14 cuenta con 40 DGCs y PDEs codificadas en su genoma. Muchas de estas enzimas afectan a distintos fenotipos [105]. Por ejemplo, se ha reportado que algunas DGCs tienen efecto en la formación de biofilms, mientras que otras no [105], y que algunas PDEs tienen efecto positivo mientras que otras negativo sobre la motilidad tipo twitching [82].

En este sentido, el hecho de que no haya ninguna DGC, ni PDE cuya expresión se module por luz en la cepa ATCC 19606 en cultivo líquido y sin agitación, como muestran nuestros resultados de RNA-seq [103] puede deberse a que en este aspecto específico de su fisiología no participe el c-di-GMP. Esto no implica que en otros aspectos de la fisiología de esta cepa, como la producción de biofilms, no haya modulación por luz de alguna DGC o PDE. El mismo análisis cabe para la cepa ATCC 17978, para la cual se mostró que tiene 11 DGCs y PDEs putativas codificadas en su genoma. En esta cepa se mostró que el c-di-GMP podría estar involucrado en la cascada de transducción de la señal lumínica inhibiendo la

formación de biofilms, mientras que no participaría en la motilidad. Por lo tanto, bien podría pasar que cuando la cepa ATCC 17978 se encuentra a 24° C, en cultivo líquido y sin agitación, sea capaz de regular la expresión o la actividad de alguna de las DGCs y/o PDEs en función de las condiciones de iluminación detectada por BlsA y de esta manera modular los niveles de c-di-GMP y producir biofilms o no. Por el contrario, cuando la cepa ATCC 17978 se encuentra en circunstancias en las que deba decidir si llevar a cabo la motilidad tipo *twitching* o permanecer estática, esta decisión sería independiente de los niveles de c-di-GMP, ya sea que se modulen por luz o no.

Es así como los resultados obtenidos en este capítulo en relación con el c-di-GMP, pueden explicarse según las siguientes posibilidades: 1) El c-di-GMP lograría ingresar a la célula y participar en la cascada de transducción de la señal lumínica según el modelo propuesto anteriormente (Figura 5.5). 2) El c-di-GMP lograría ingresar a la célula y afectar negativamente la producción de biofilms, independientemente de la transducción de la señal lumínica. 3) El c-di-GMP no lograría ingresar a la célula, pero en el medio extracelular sería capaz de formar complejos, secuestrar ciertas moléculas extracelulares que sean importantes para la formación de biofilms o afectar negativamente las interacciones intercelulares o las estructuras necesarias para dar este fenotipo. 4) El c-di-GMP no lograría ingresar a las células, pero es capaz de unirse a un receptor de superficie el cual puede gatillar eventos de señalización modulando la expresión génica y de proteínas, dando finalmente la inhibición de la formación de biofilms.

5.2.2. Participación del producto del gen *bof* en la transducción de la señal lumínica.

Se ha reportado que el gen *ygiW*, que tiene un dominio de unión a oligonucleótido/oligosacárido (BOF), regula la formación de biofilms en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [106]. Por otro lado, en *E. coli* se vio que un gen homólogo a *ygiW* afecta la motilidad y la virulencia en respuesta a la detección de *quorum* y señales hormonales [107]. Esto sugiere que el producto del gen *bof* en *A. baumannii* podría estar involucrado al menos en la regulación de estas dos características fenotípicas. Además y como ya se mencionó en la introducción, el gen que codifica por la proteína putativa BOF se

encuentra muy próximo al gen que codifica por el fotorreceptor BlsA, haciendo que sea muy probable que estén involucrados en una misma vía.

5.2.2.1. Análisis *in silico* del gen *bof* y el interactoma de la proteína BOF.

Los análisis de transcriptómica realizados sobre la cepa ATCC 19606, revelaron que el gen *bof* es uno de los 54 genes que presentan mayor diferencia en sus niveles de expresión entre condiciones de iluminación y de oscuridad (más en luz que en oscuridad) (Figura 5.6; [103]).

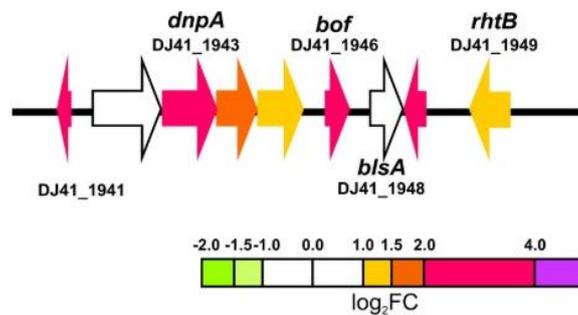


Figura 5.6. Representación esquemática de la región genómica que contiene al gen *blsA* y *bof*, inducido por luz. Cada flecha representa un gen. Los colores representan diferentes grados de expresión génica diferencial en luz versus oscuridad, basado en la escala de colores de la barra en la parte inferior.

Además, como se mencionó anteriormente, al localizarse adyacente a *blsA* y en una orientación idéntica, cabe la posibilidad que sean parte de un mismo operón, y/o que los productos de estos dos genes estén involucrados en una misma vía regulatoria. Análisis *in silico* indican que BlsA y la proteína BOF interaccionarían entre sí (Figura 5.7), aumentando las probabilidades de que el producto del gen *bof* pueda funcionar en ciertos casos como un efector del fotorreceptor.

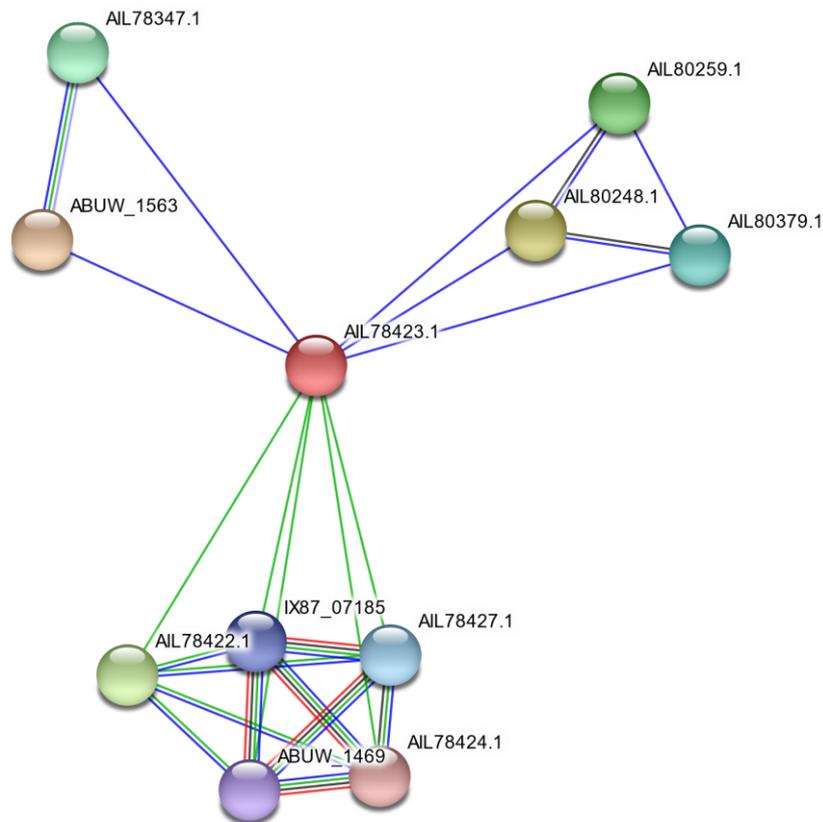


Figura 5.7. Análisis *in silico* que muestra las posibles proteínas interactuantes con BOF (AIL78423.1). Se puede identificar entre ellas a BlsA (AIL78422.1), una proteína con un dominio de cierre de glicina (ABUW_1563), un transportador ABC de ácidos grasos de cadena larga (AIL_80379.1), una proteína que tiene un dominio de unión desconocido llamado duf2846 (AIL_80248.1), una acil-CoA deshidrogenasa (AIL_78427.1), una proteína tipo glucosamina 6 fosfato desaminasa (IX87_07185), una metil transferasa de clase 1 dependiente de SAM (ABUW_1469) y una glicosil transferasa (AIL78424.1). Este gráfico se construyó utilizando la base de datos biológica string-db.org

Vale la pena destacar, como se puede observar en la figura 5.7, que hay 4 proteínas que estarían interaccionando con BlsA y con BOF. Una acil-CoA deshidrogenasa (AIL_78427.1), una proteína tipo glucosamina 6 fosfato desaminasa (IX87_07185), una metil transferasa de clase 1 dependiente de S-Adenosil-Metionina (ABUW_1469) y una glicosil transferasa (AIL78424.1). Todas estas están involucradas en una gran variedad de funciones a nivel celular incluyendo el metabolismo y la regulación de la expresión génica a nivel epigenético.

En nuestro grupo de trabajo se ha confirmado que en condiciones de luz, la proteína BlsA interacciona con BOF (Tuttobene y col., manuscrito en preparación), resultados que sostienen los obtenidos en esta tesis.

5.2.2.2. El producto del gen *bof* afecta a la motilidad de la mutante $\Delta bIsA$ a 23° C y 37° C.

Para evaluar la función de la proteína BOF dos estrategias posibles incluyen la generación de una mutante isogénica en el gen *bof* de manera de eliminar la presencia de la proteína en la célula, mientras que la otra se basa en aumentar el número de copias de este gen, de manera de generar más copias de su producto en la célula. En este sentido, en nuestro grupo de trabajo se está intentando generar la mutante en *bof*, mientras que en paralelo se generó una cepa derivada de la ATCC 17978 conteniendo el plásmido pWH1266-Pbof, de modo de aumentar considerablemente su representación génica y la correspondiente proteína. Vale mencionar que en este plásmido, el gen *bof* se encuentra bajo el control de su propio promotor.

Como se puede observar en las figuras 5.8 y 5.9, cuando se hicieron ensayos de motilidad a 23° C utilizando la cepa ATCC 17978 conteniendo el plásmido pWH1266-Pbof, esta sufrió una inhibición total de su motilidad en condiciones de luz azul, mientras que en oscuridad se movió ocupando toda la superficie de la placa. Tal como se reportó anteriormente, el mismo fenotipo se observó para la cepa salvaje ATCC 17978 y para la cepa salvaje conteniendo el plásmido pWH1266, utilizadas como control [12], [23].

En los ensayos realizados con la cepa mutante en el fotorreceptor $\Delta bIsA$ conteniendo el plásmido pWH1266-Pbof se observó una inhibición parcial de la motilidad en condiciones de luz, mientras que, en condiciones de oscuridad, las bacterias se movieron por toda la superficie de la placa (Figura 5.8 y 5.9). Esto difiere de los resultados obtenidos con la $\Delta bIsA$ y con la $\Delta bIsA$ conteniendo el plásmido pWH1266, utilizadas como control, las cuales se mueven por toda la superficie de la placa en condiciones de luz azul, como en oscuridad (Figura 5.8 y 5.9) [12], [23].

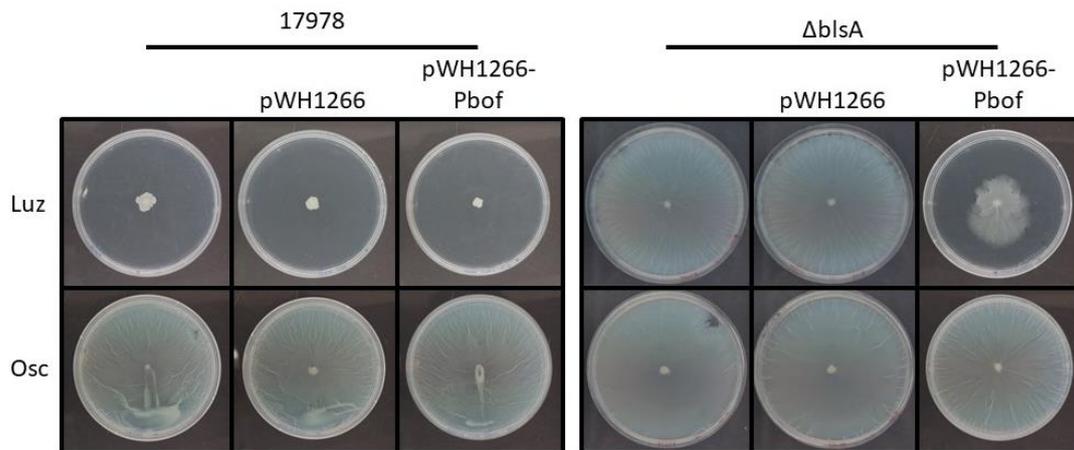


Figura 5.8. Ensayo representativo de la motilidad a 23° C en condiciones de luz y oscuridad para la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 y su mutante isogénica en el fotorreceptor ($\Delta bIsA$), transformadas o no con el plásmido pWH1266 o con el plásmido pWH1266-Pbof.

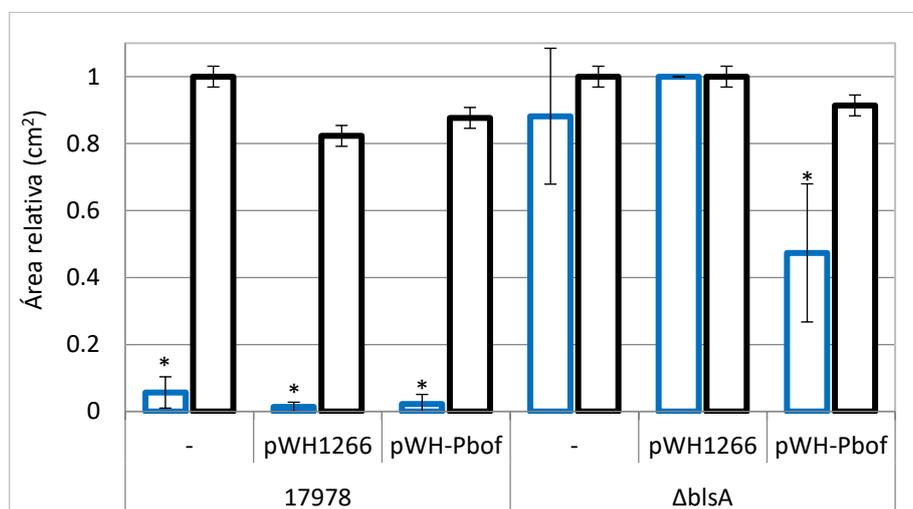


Figura 5.9. Cuantificación del área de motilidad de *A. baumannii* ATCC 17978 y su mutante isogénica en el fotorreceptor conteniendo a los plásmidos pWH1266-Pbof o bien pWH1266 vacío. Las barras blancas con contorno azul indican incubación en luz azul a 23° C. Las barras blancas con contorno negro indican incubación en oscuridad a 23° C.

Posteriormente, se hicieron ensayos a 37° C sobre la cepa mutante $\Delta bIsA$ para evaluar si el efecto del producto del gen *bof* se mantendría a altas temperaturas.

Los resultados obtenidos muestran que, a 37° C, la cepa mutante también sufrió una inhibición parcial de la motilidad (Figura 5.10), mientras que las cepas utilizadas como control se movieron por toda la superficie de la placa en ambas condiciones de iluminación.

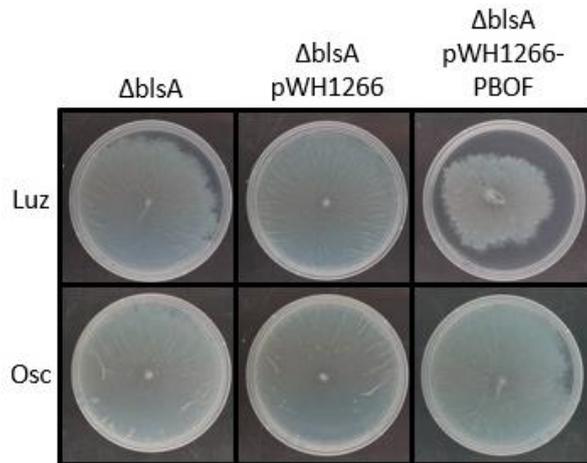


Figura 5.10. Ensayo representativo de la motilidad a 37° C y en condiciones de luz y oscuridad para la cepa mutante en el fotorreceptor ($\Delta bIsA$) sin transformar, transformada con el plásmido pWH1266 o con el plásmido pWH1266-Pbof.

A partir de estos ensayos se pudo ver claramente que a ambas temperaturas ensayadas solo se afecta la motilidad de la cepa $\Delta bIsA$ conteniendo el plásmido pWH1266-Pbof cuando estuvo expuesta a la luz azul.

5.2.2.3. El producto del gen *bof* modifica la producción de biofilms en la cepa ATCC 17978 a 23° C y 37° C.

Posteriormente, se evaluó la posible participación del producto del gen *bof* en la fotorregulación de la producción de biofilms en *A. baumannii*. Por lo tanto, se analizó el efecto del aumento del número de copias de BOF sobre la capacidad de formación de biofilms de la cepa salvaje ATCC 17978 y la mutante en el fotorreceptor $\Delta bIsA$. Los ensayos realizados a 23° C en tubos de vidrio muestran que la cepa salvaje conteniendo el plásmido pWH1266-Pbof produjo biofilms en condiciones de luz y en niveles similares a los observados en oscuridad (Figura 5.9). Por su parte, y tal como se reportó previamente [12], [23], la cepa salvaje y la cepa salvaje conteniendo el plásmido pWH1266, utilizadas como control, no produjeron biofilms en condiciones de luz, mientras que sí lo hicieron en condiciones de oscuridad (Figura 5.11).

En el caso de la cepa $\Delta bIsA$ conteniendo el plásmido pWH1266-Pbof, se produjo biofilms en ambas condiciones de iluminación, observándose el mismo fenotipo que para la $\Delta bIsA$ y la $\Delta bIsA$ conteniendo el plásmido pWH1266, utilizadas como control (Figura 5.11).

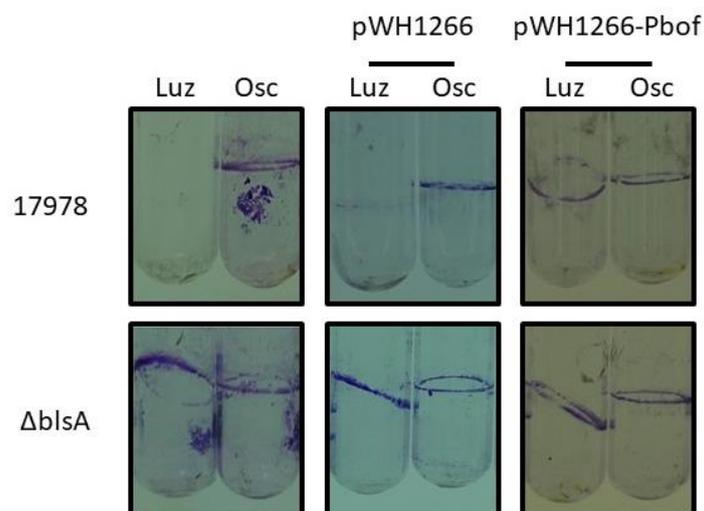


Figura 5.11. Ensayo representativo de la producción de biofilms a 23° C en las células de *A. baumannii* ATCC 17978 salvaje y en la mutante isogénica en el fotorreceptor (Δ blsA), transformadas o no con el plásmido pWH1266 o pWH1266-Pbof según corresponda, en condiciones de luz u oscuridad.

5.2.2.4. Discusión.

Al comparar los resultados obtenidos en los ensayos de formación de biofilms para la cepa ATCC 17978 pWH1266-Pbof (donde se produjo biofilm en condiciones de luz y de oscuridad), con aquellos para sus controles ATCC 17978 y ATCC 17978 pWH1266 (donde se produjo biofilms solo en condiciones de oscuridad), se puede descartar que este efecto sea producto del plásmido en sí mismo. Por lo tanto, los resultados se deberían a la presencia de múltiples copias del gen *bof* resultando en múltiples copias del correspondiente producto en las células.

Según nuestros estudios de transcriptómica, los niveles del transcripto *bof* son mucho mayores en condiciones de luz que en oscuridad (Figura 5.6), mientras que los niveles de BlsA son menores en luz que en oscuridad (Figura 4.4). Así, la regulación de sus concentraciones relativas puede ser la clave para comprender la modulación por luz de la formación de biofilms. Además, en el plásmido pWH1266-Pbof, el gen *bof* está clonado bajo el control de su propio promotor, por lo que se esperaría que las cepas conteniendo este plásmido, expresen el producto génico en mayor cantidad en luz, que en oscuridad.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se construyó el modelo que se muestra a continuación para intentar explicar la modulación por luz de la formación de biofilms mediado por BlsA (Figura 5.12).

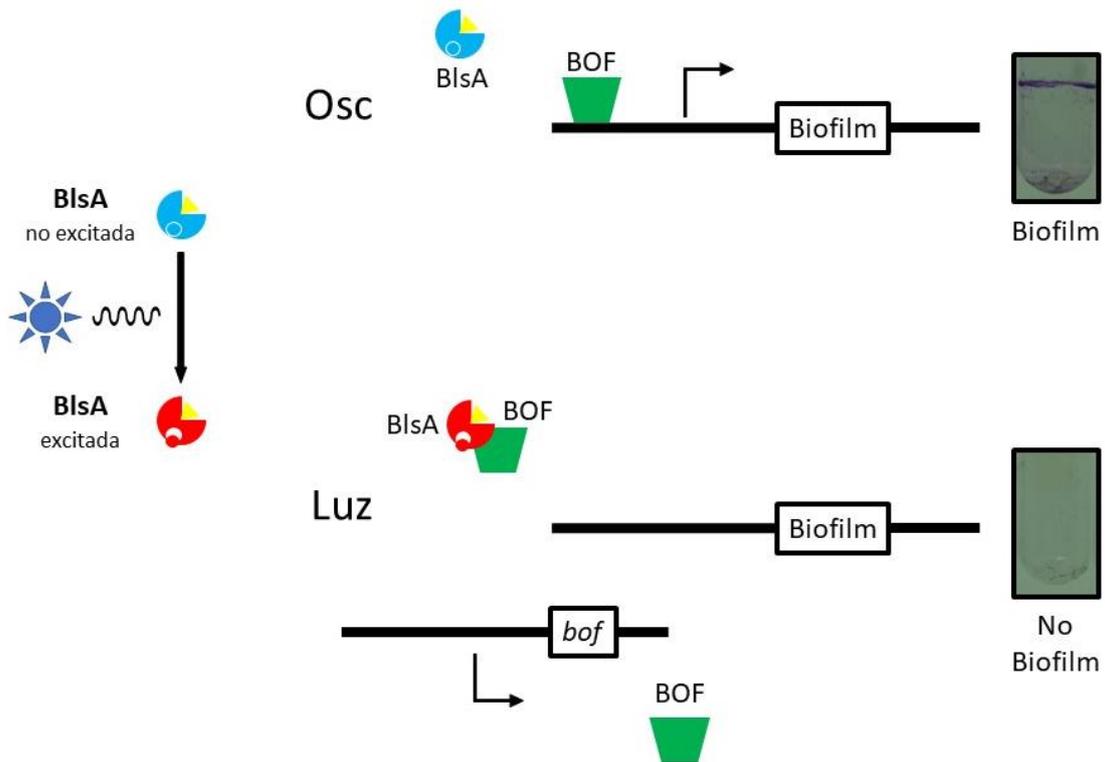


Figura 5.12. Modelo de regulación de la formación de biofilms mediado por BOF, a 24° C. En condiciones de oscuridad (Osc), la proteína BOF se uniría al promotor de los genes involucrados en la producción de biofilm, activando su transcripción y por consiguiente llevando a la producción de biofilms. En condiciones de luz, BlsA antagoniza con BOF, secuestrándolo y evitando su unión al ADN. Los genes necesarios para la producción de biofilms no se expresarían y por lo tanto no se produciría este fenotipo. Además, en condiciones de luz, hay una mayor expresión del gen *bof* que en condiciones de oscuridad.

En este modelo se propone que a 24° C y en condiciones de oscuridad, el producto del gen *bof* sería capaz de unirse al ADN y de este modo activar la transcripción de los genes involucrados en la producción de biofilms. Por el contrario, en condiciones de luz, BlsA antagonizaría el funcionamiento de BOF, secuestrándolo y evitando su unión al ADN. Así, no se produciría la transcripción de los genes cuyos productos son necesarios para la producción de biofilms y no se formaría esta estructura multi-celular.

Cuando se transforma la cepa salvaje ATCC 17978 con el plásmido pWH1266-Pbof, se aumentarían los niveles de BOF y este aumento sería mayor en luz que en oscuridad. Por lo tanto, en condiciones de oscuridad, donde BlsA no interacciona con BOF al igual que en el caso de la cepa salvaje, no se produciría un efecto en la regulación y se formarían biofilms (Figura 5.11). En cambio, en condiciones de luz, el contenido de BOF fácilmente superaría al contenido de BlsA, por lo que quedaría una cantidad suficiente de BOF libre que podría

unirse al ADN activando la transcripción de los genes cuyos productos son necesarios para la producción de biofilms.

En el caso de la mutante Δ blsA, la ausencia del fotorreceptor hace que la cepa se comporte siempre como si estuviera en oscuridad, por lo que el modelo planteado podría explicar el fenotipo observado para esta cepa y también para el caso de la mutante conteniendo el plásmido pWH1266-Pbof (Figura 5.11).

Los modelos planteados en esta tesis son consistentes con los resultados de otros miembros de nuestro grupo, que muestran que BlsA modula el funcionamiento de reguladores transcripcionales.

Por otro lado, en cuanto a la motilidad, al comparar los resultados obtenidos para la cepa Δ blsA conteniendo el plásmido pWH1266-Pbof con los obtenidos para el control Δ blsA pWH1266 y Δ blsA se puede descartar que el efecto de la inhibición parcial sea producto del plásmido en sí mismo. Esto indicaría que la variación en el fenotipo se debe a la presencia de múltiples copias del gen *bof* resultando en múltiples copias del correspondiente producto en las células y del efecto de la luz.

Por lo tanto, los resultados sugieren que podría haber otro sistema de detección de la luz independiente de BlsA que es capaz de generar la inhibición parcial de la motilidad solo en presencia de un elevado número de copias de BOF. En este sentido, se ha reportado que en *Myxococcus xanthus* la protoporfirina IX se excita por absorción de la luz azul, generando oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) y de esta manera modula la expresión génica (Galbis-Martínez et al. 2012; Ortiz-Guerrero et al. 2011).

Actualmente, en nuestro grupo de trabajo, se están llevando adelante experimentos para corroborar estos modelos.

5.3. Conclusiones.

En este capítulo se muestra la evidencia experimental que se obtuvo y que plantea al c-di-GMP y al producto del gen *bof* como posibles intermediarios en la cadena de transducción de la señal lumínica.

Específicamente, el c-di-GMP estaría involucrado en la cascada de transducción de la señal que lleva a la formación de biofilms, mientras que no estaría involucrado en la transducción de la señal que lleva a la motilidad.

A su vez, en analogía con otros organismos, los niveles de c-di-GMP podrían estar regulados por algunas de las 11 DGCs y PDEs putativas encontradas en el genoma de *A. baumannii*, dependiendo de las circunstancias en las que se encuentre la célula.

Por otro lado, las evidencias indican que el gen *bof* se expresa diferencialmente, encontrándose mayores niveles de su transcrito en luz que en oscuridad. Además, los análisis *in silico* indicarían que BlsA y BOF pueden interactuar en condiciones de luz (lo cual se confirmó recientemente por otros miembros de nuestro grupo) y que a su vez pueden interactuar con varias proteínas involucradas en el metabolismo y la regulación de la expresión génica.

En cuanto a la formación de biofilms y la motilidad, las evidencias indicarían que el producto del gen *bof* estaría involucrado en la transducción de la señal lumínica que lleva a estos fenotipos. Si bien la participación del producto del gen *bof* en la formación de biofilms parece depender de BlsA, los resultados obtenidos indicarían que en el caso de la motilidad posiblemente dependerían de alguna otra molécula fotosensible y que sería independiente de BlsA.

Finalmente, se construyeron modelos que permiten explicar estos resultados y que están de acuerdo con evidencias obtenidas por otros miembros de nuestro grupo.

*La susceptibilidad a
ciertos antibióticos está
regulada por luz en A.
baumannii*

6. La susceptibilidad a ciertos antibióticos está regulada por luz en *A. baumannii*.

6.1. Introducción

Nuestro grupo de trabajo ha reportado que la luz gobierna diversos procesos relacionados con la capacidad de *Acinetobacter baumannii* para persistir y vivir en el ambiente [12]. Como ya se mencionó en capítulos anteriores, se vio que la luz azul inhibe la motilidad y la formación de biofilms en células de *A. baumannii* cultivadas a 24° C y aumentó la capacidad de la bacteria para matar a la forma filamentosa del hongo eucariota *Candida albicans* [12]. Se reportó que esta respuesta a la luz depende de BlsA, el único fotorreceptor proteico clásico codificado en su genoma [12] y que la respuesta a la luz está distribuida entre otras especies pertenecientes al género *Acinetobacter* [23].

Otro factor determinante para el éxito de *A. baumannii* como patógeno es su capacidad de adquirir resistencia a antibióticos, para lo cual su plasticidad genómica y capacidad para el intercambio genético es sumamente importante [3], [109], [110]. De hecho, para este organismo, se fueron incrementando las tasas de resistencia a muchas drogas en este último tiempo, lo cual plantea un panorama complicado en el que la mayoría de las cepas circulantes son resistentes a múltiples drogas (MDR), resultando en que la mayoría de los antibióticos disponibles se vuelvan obsoletos [111]. Es por esto por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) señaló a este microorganismo como primero dentro de la lista de los de importancia crítica (World Health Organization 2017).

Los antibióticos carbapenemes, como imipenem y meropenem, son utilizados como último recurso para combatir infecciones causadas por *A. baumannii*. Sin embargo, estos microorganismos han desarrollado resistencia inclusive a estos antibióticos, complicando severamente la terapéutica [112]–[114].

Los antibióticos minociclina (MIN) y su derivado tigeciclina (TIG), son antibióticos del tipo de la tetraciclina (TET), capaces de confrontar ciertas infecciones causadas por *A. baumannii* multirresistente. Por esto, constituyen una importante opción para tratar las infecciones causadas por esta bacteria [115], [116].

Con el objetivo de evaluar la posible modulación por luz de la susceptibilidad a antibióticos, se hicieron en nuestro grupo de trabajo ensayos de antibiogramas en condiciones de luz y de oscuridad, en una colección de cepas clínicas de *A. baumannii*. Se trabajó a 24° C, ya que si bien no es la temperatura de los hospedadores de sangre caliente, es aquella en la que se vio que *A. baumannii* es capaz de fotorregular varias características fisiológicas [12].

En la figura 6.1 se observa que los diámetros de la zona de inhibición del crecimiento de la cepa ATCC 19606 para los antibióticos MIN y TIG resultaron menores en condiciones de luz azul que en oscuridad. Estos resultados se verificaron en una amplia colección de cepas clínicas, siendo las que presentaron mayores diferencias fueron las cepas A118, A42 y ATCC 19606 (entre 12 y 14 mm) [117]. También se estudió la susceptibilidad a los antibióticos MIN y TIG en medio líquido a 24° C y se determinó que para las tres cepas ensayadas (A42, A118 y ATCC 19606) la luz genera una disminución de la susceptibilidad a estos antibióticos.

Es importante mencionar que se efectuaron los controles que indican que el efecto observado no se debe a la degradación de los antibióticos por luz. Así, la luz modula la susceptibilidad a los antibióticos MIN y TIG en *A. baumannii*.

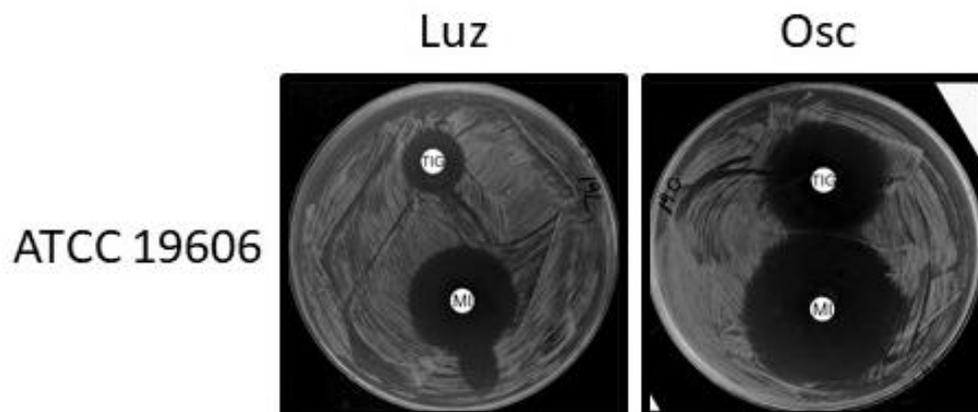


Figura 6.1. Antibiogramas para los antibióticos MIN y TIG utilizando la cepa ATCC 19606 en luz azul o en oscuridad a 24° C.

Viendo que la luz es capaz de modular la susceptibilidad a los antibióticos MIN y TIG, se quiso estudiar el mecanismo por el cual se lleva a cabo esta regulación.

6.2. Resultados y discusión.

6.2.1. La luz azul induce la expresión de genes de resistencia a TIG en *A. baumannii*.

6.2.1.1. La luz azul induce la expresión de los genes de resistencia a TIG *adeABC*.

Se ha reportado que en *A. baumannii* las bombas de eflujo Tet(B) y AdeABC están involucradas en la resistencia a MIN y TIG respectivamente [51], [118], [119].

Tet(B) es una bomba de eflujo específica para tetraciclina capaz de expulsar MIN y tetraciclina [118]. En el caso de TIG, se vio que la sobreexpresión de los genes *adeABC* puede desempeñar un papel en el desarrollo de la resistencia o en la disminución de la susceptibilidad a este antibiótico [120]

Una búsqueda bioinformática en la cepa A118 indicó que el determinante *tet(B)* no está presente en su genoma. Además, no se encontraron homólogos a *tet(B)* en búsquedas bioinformáticas en la cepa ATCC 19606 y los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizados para detectarlo, dieron resultados negativos. Todo esto indica que la modulación por luz a la resistencia a MIN depende de un mecanismo que no involucra a Tet(B).

Para estudiar si en la modulación por luz de la susceptibilidad a antibióticos contribuye alguno de los mecanismos conocidos, se estudiaron los niveles de expresión de los transcritos *adeABC* en función de la exposición de las células a la luz azul.

Para esto, se recolectaron células de las cepas ATCC 19606 o A42 a partir de cultivos que crecieron en medio líquido, a 24° C, en luz azul o en oscuridad. Los resultados indican que los niveles de transcritos de *adeA*, *adeB* y *adeC* se inducen aproximadamente 2-5 veces más por luz en la cepa ATCC 19606 (Figura 6.2) que en oscuridad.

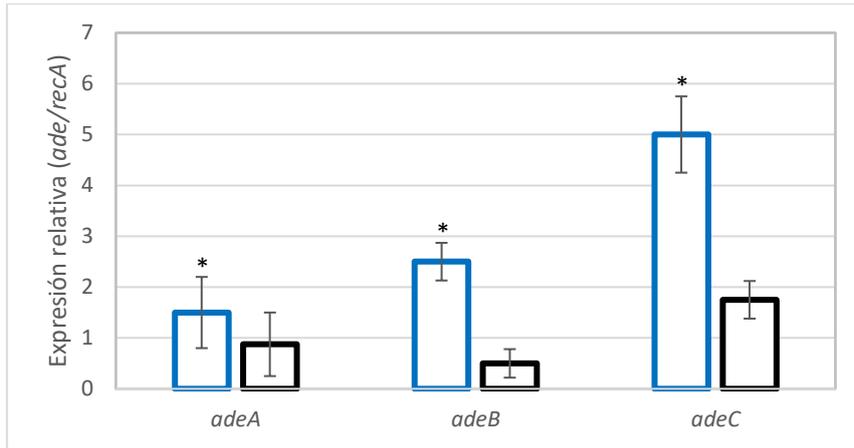


Figura 6.2. Efecto de la luz en la expresión de los transcritos *adeABC* en células de *A. baumannii* ATCC 19606 incubadas a 24° C en condiciones de luz azul (barras blancas con contorno azul) u oscuridad (barras blancas con contorno negro). Los asteriscos indican valores estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

Es sorprendente que en presencia de concentraciones de TIG inferiores a la Concentración Inhibitoria Mínima (sub-CIM) (0,1 µg/ml) en el medio de cultivo, la diferencia en los niveles de expresión de los transcritos *adeA* y *adeB* entre luz y oscuridad se aumentó enormemente, mostrando inducciones de aproximadamente 60 y 18 veces respectivamente (figura 6.3).

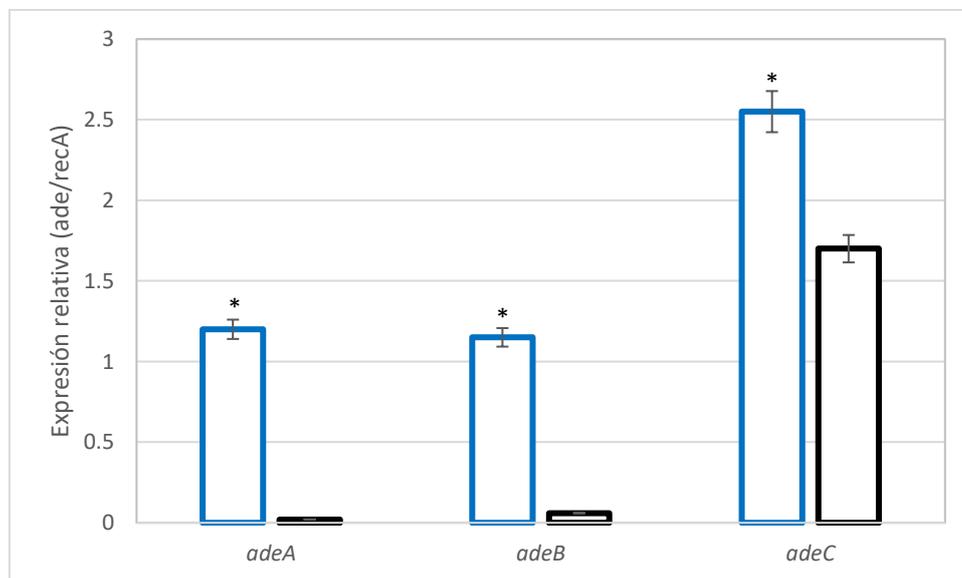


Figura 6.3. Efecto de la luz en la expresión de los transcritos *adeABC* en células de *A. baumannii* ATCC 19606 crecidas en presencia de concentraciones sub-CIM de TIG (0,1 µg/ml), incubadas a 24° C en condiciones de luz azul (barras blancas con contorno azul) u oscuridad (barras blancas con contorno negro). Los asteriscos indican valores estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

En el caso de la cepa A42 creciendo en fase exponencial en LB, los transcritos *adeA* y *adeB* se indujeron 2 veces más en luz azul que en oscuridad, mientras que los transcritos de *adeC* se indujeron aproximadamente 13 veces más en luz que en oscuridad (Figura 6.4).

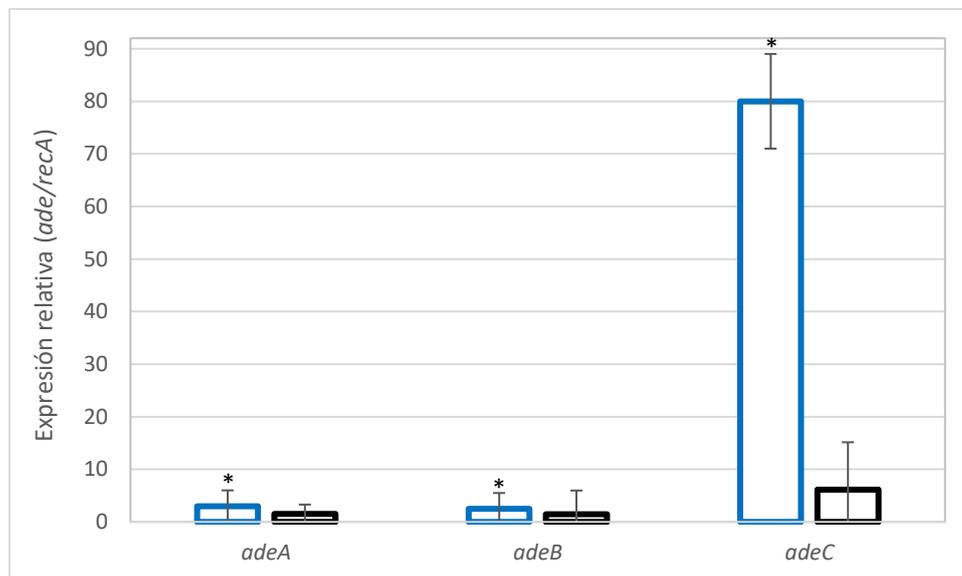


Figura 6.4. Efecto de la luz en la expresión de los transcritos *adeABC* en células de *Acinetobacter sp.* A42 incubadas a 24° C y en condiciones de luz azul (barras blancas con contorno azul) o de oscuridad (barras blancas con contorno negro). Los asteriscos indican valores estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

Cuando se agregó al medio de cultivo TIG en una concentración inferior a la CIM (0,1 µg/ml) los niveles de transcritos de *adeB* y *adeC* se incrementaron 8 y 17 veces respectivamente entre luz y oscuridad (Figura 6.5).

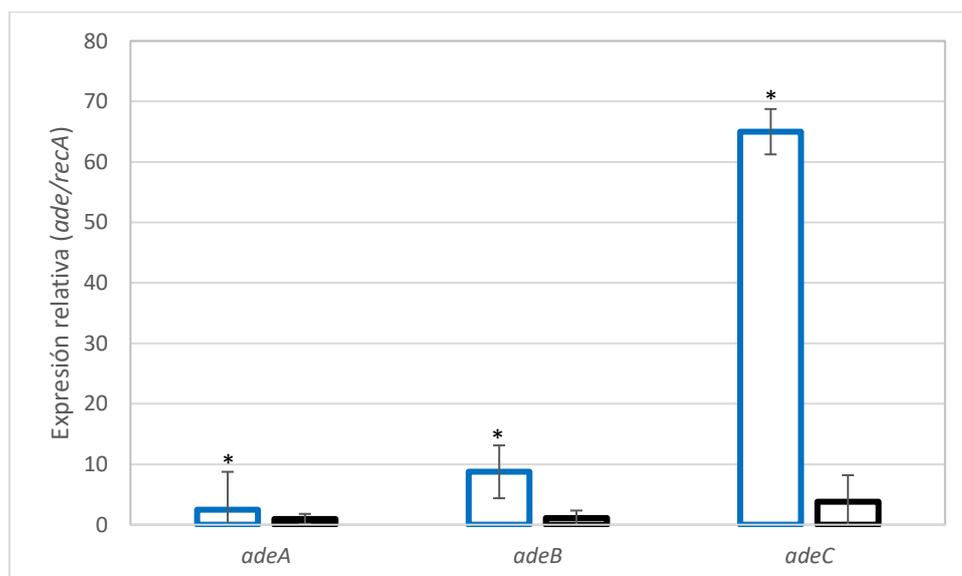


Figura 6.5. Efecto de la luz en la expresión de los transcritos *adeABC* en células de *Acinetobacter sp.* A42 crecidas en presencia de concentraciones sub-CIM de TIG (0,1 µg/ml), incubadas a 24° C en condiciones de luz azul (barras blancas con

contorno azul) u oscuridad (barras blancas con contorno negro). Los asteriscos indican valores estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

Estos resultados indican que hay una correlación entre la inducción de genes que codifican por miembros de la bomba de eflujo AdeABC por luz y la reducción en la susceptibilidad a TIG observada en presencia de luz, sugiriendo que la misma podría estar involucrada en la disminución de la susceptibilidad inducida por luz.

6.2.1.2. La luz azul induce la expresión de los genes de la bomba *adeIJK*.

Además de AdeABC, se ha reportado que *A. baumannii* cuenta con otra bomba de eflujo capaz de expulsar antibióticos tales como MIN y TIG [121]. Esta bomba de eflujo está compuesta por los productos de los genes *adeIJK*, que se transcriben en un mismo operón [121] y su transcripción está regulada por AdeN [122]. Además, se reportó que los sistemas de eflujo AdeABC y AdeIJK contribuyen de una manera más que aditiva a la resistencia a TET, MIN y TIG [121].

Así, se analizaron los niveles de expresión de los transcritos *adeIJK* en células expuestas a la luz azul y en oscuridad. Para esto, se tomaron muestras de las cepas ATCC 19606 o A42 crecidas en fase exponencial en LB a 24° C y en luz azul y en oscuridad.

Los resultados indican que en la cepa ATCC 19606, los niveles de los transcritos de los genes *adeIJ* aumentaron entre 5 y 9 veces aproximadamente en luz respecto de los niveles en oscuridad (Figura 6.6).

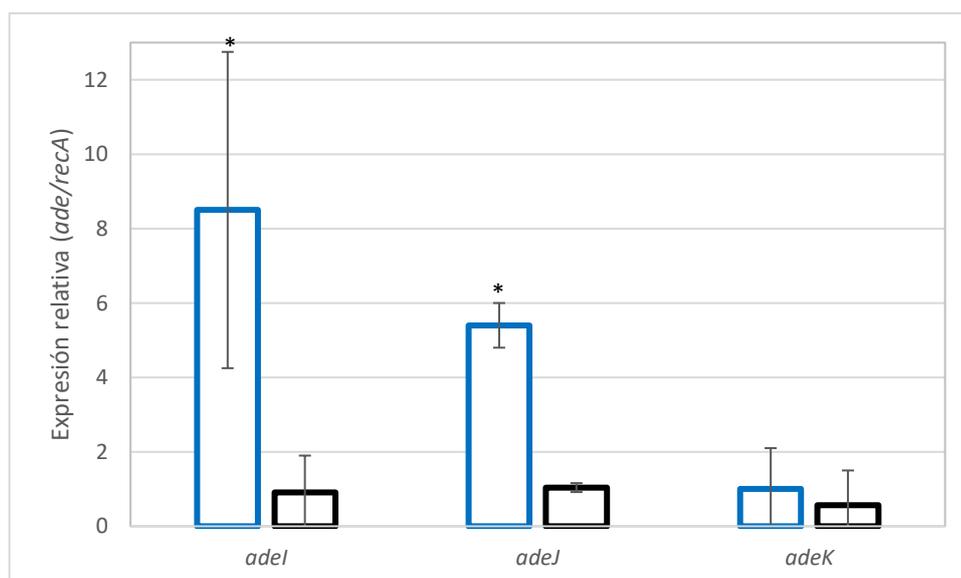


Figura 6.6. Efecto de la luz en la expresión de los transcritos *adeIJK* en células de *A. baumannii* ATCC 19606 incubadas a 24° C en condiciones de luz azul (barras blancas con contorno azul) u oscuridad (barras blancas con contorno negro). Los asteriscos indican valores estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

Cuando se crecieron células de ATCC 19606 en presencia de concentraciones sub-CIM de TIG (0,1 µg/ml) la diferencia de los niveles de los transcritos de los genes *adeI* entre luz y oscuridad aumentó, similarmente a lo que ocurre con los genes *adeAB*. En el caso de los genes *adeI*, la diferencia en presencia de TIG fue de aproximadamente 8 y 12 veces respectivamente (Figura 6.7).

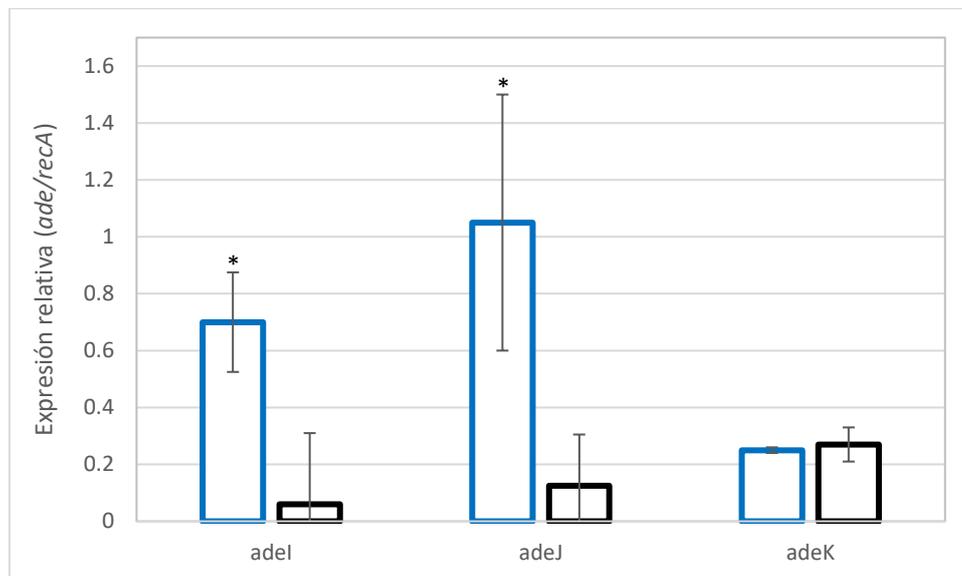


Figura 6.7. Efecto de la luz en la expresión de los transcritos *adeIJK* en células de *A. baumannii* ATCC 19606 crecidas en presencia de concentraciones sub-CIM de TIG (0,1 µg/ml), incubadas a 24° C en condiciones de luz azul (barras blancas con contorno azul) u oscuridad (barras blancas con contorno negro). Los asteriscos indican valores estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

Estos mismos ensayos se hicieron también para la cepa A42 creciendo en fase exponencial en LB. Los transcritos *adeI* y *adeJ* se indujeron aproximadamente entre 1,5 y 2 veces más en luz que en oscuridad, mientras que los transcritos de *adeK* se indujeron 25 veces más e luz azul que en oscuridad (Figura 6.8).

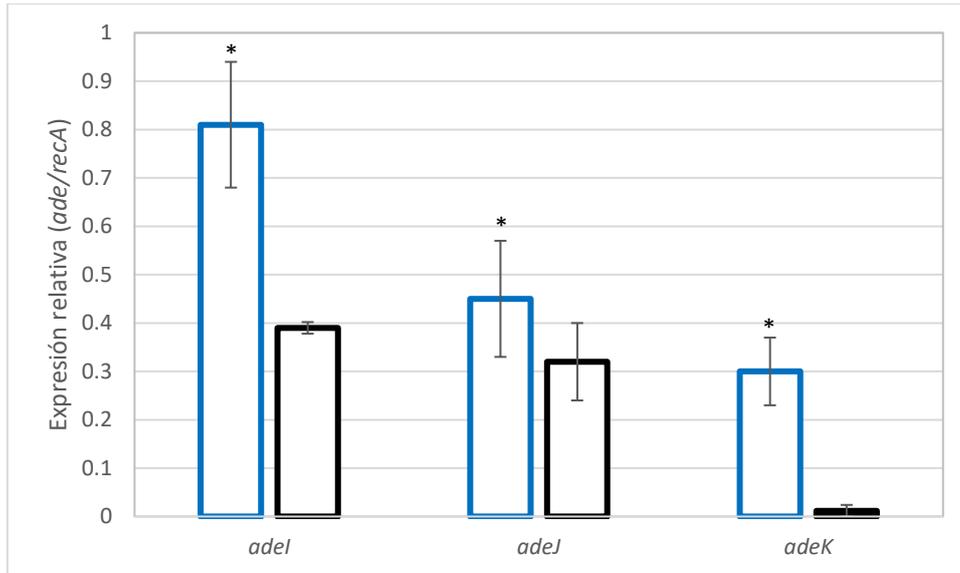


Figura 6.8. Efecto de la luz en la expresión de los transcritos *adeIJK* en células de *Acinetobacter sp. A42* incubadas a 24° C y en condiciones de luz azul (barras blancas con contorno azul) o de oscuridad (barras blancas con contorno negro). Los asteriscos indican valores estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

Cuando se agregó al medio de cultivo TIG en una concentración inferior a la CIM (0,1 $\mu\text{g/ml}$) los niveles de transcritos de *adeI*, *adeJ* y *adeK* se incrementaron aproximadamente 60; 3 y 23 veces respectivamente, entre luz y oscuridad (Figura 6.9).

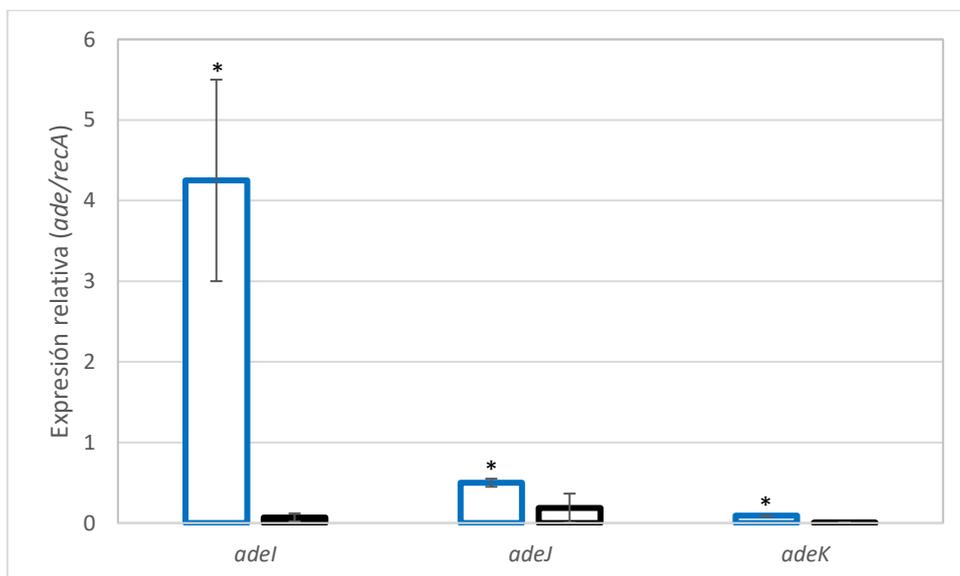


Figura 6.9. Efecto de la luz en la expresión de los transcritos *adeIJK* en células de *Acinetobacter sp. A42* crecidas en presencia de concentraciones sub-CIM de TIG (0,1 $\mu\text{g/ml}$), incubadas a 24° C en condiciones de luz azul (barras blancas con contorno azul) u oscuridad (barras blancas con contorno negro). Los asteriscos indican valores estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

Estos resultados indican que hay una correlación entre la inducción de genes que codifican por miembros de la bomba de eflujo *AdeIJK* por luz y la reducción en la susceptibilidad a TIG observada en presencia de luz.

Posteriormente, se quiso averiguar qué ocurre con los niveles de expresión del regulador transcripcional *adeN*. Para esto, se utilizaron muestras de las cepas ATCC 19606 y A42 crecidas en luz y oscuridad a 24° C.

Como se puede ver en la figura 6.10, los resultados indican que hay una diferencia en los niveles del transcripto *adeN* entre ambas condiciones de iluminación. Además, los niveles del transcripto son de aproximadamente 2 a 3 veces mayores en condiciones de luz que en oscuridad para ambas cepas ensayadas.

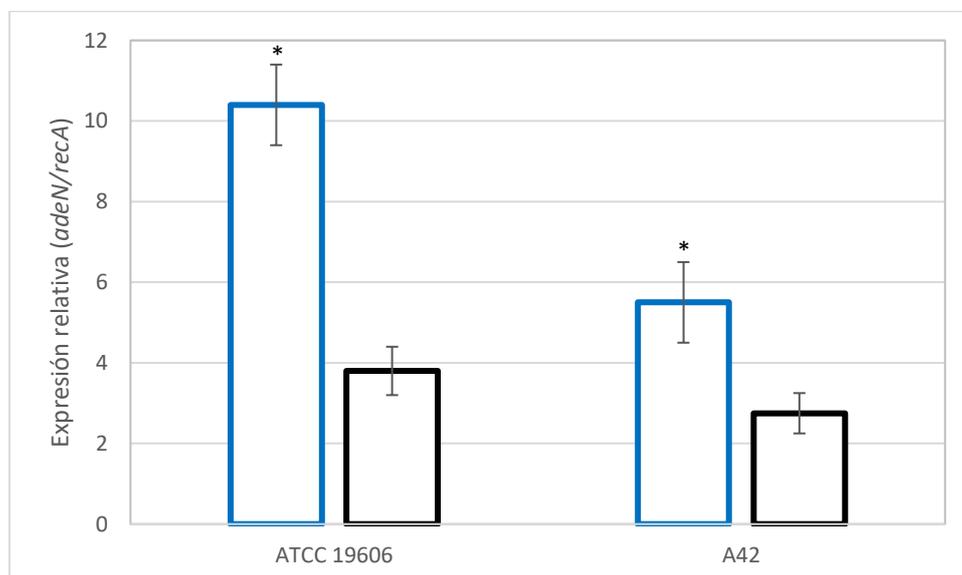


Figura 6.10. Efecto de la luz en la expresión del transcripto *adeN*, que codifica por el regulador transcripcional de *adeIJK*, en las cepas ATCC 19606 y A42 a 24° C. Las barras blancas con contorno azul indican exposición a luz azul, mientras que las barras blancas con contorno negro indican incubación en oscuridad. Los asteriscos indican valores estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

Estos resultados indican que la expresión de *adeN*, que codifica por el regulador de la transcripción de los componentes de la bomba de eflujo *AdeIJK*, también depende de las condiciones de iluminación.

6.2.1.3. Discusión

En esta sección se pudo ver que en presencia de luz azul, aumenta la expresión de los genes *adeABC* y *adeIJK* (que codifican para las bombas de eflujo *AdeABC* y *AdeIJK* respectivamente), así como la de *adeN*, el regulador transcripcional de *adeIJK* en las cepas

de *A. baumannii* A42 y ATCC 19606. Así, existe una correlación entre la reducción de la susceptibilidad a TIG y la inducción de los genes que codifican por las bombas de eflujo en luz. Esto sugiere fuertemente que estos mecanismos podrían contribuir directamente a la reducción de la susceptibilidad por luz observadas para los antibióticos MIN y TIG. Estos resultados son especialmente interesantes, teniendo en cuenta que como se mencionó anteriormente, los sistemas de eflujo AdeABC y AdeIJK contribuyen de una manera más que aditiva a la resistencia a TET, MIN y TIG [121]. En este trabajo ofrecemos indicios de que las bombas de eflujo AdeABC y AdeIJK actúan concertadamente.

Cuando estas cepas recuperadas de ambientes hospitalarios se encuentran produciendo infecciones en heridas superficiales, podrían interpretar la luz como señal de la necesidad de una estrategia defensiva y una competencia más férrea para la subsistencia, lo que haría posible la posterior colonización del hospedador.

En este contexto, el aumento en la resistencia a MIN y TIG como respuesta a la señal de la luz puede indicarle a la bacteria la necesidad de persistir hasta que las condiciones sean más favorables para el crecimiento o hasta que se puedan acumular determinantes de resistencia adicionales.

6.2.2. La modulación de la susceptibilidad a MIN y TIG en *A. baumannii* no depende del fotorreceptor BlsA.

6.2.2.1. Las cepas mutantes en el fotorreceptor *blsA* no ven alterada la susceptibilidad a MIN y TIG entre luz y oscuridad.

Para determinar si la fotorregulación de la susceptibilidad a antibióticos está mediada por el fotorreceptor BlsA, se construyó una cepa ATCC 19606 mutante en *blsA* (19606 Δ *blsA*), usando una estrategia similar a la utilizada para la construcción de la cepa ATCC 17978 Δ *blsA* [12]. Cuando se ensayó la capacidad de esta mutante de fotorregular la susceptibilidad a los antibióticos MIN y TIG se vio que el halo inhibitorio es mayor en oscuridad que en luz, en niveles similares a los de la cepa ATCC 19606 salvaje utilizada como control (Figura 6.11, Tabla 6.1). De la misma manera, cuando se ensayó la capacidad de la cepa ATCC 17978 Δ *blsA* de fotorregular la susceptibilidad a los mismos antibióticos se vio el mismo resultado que para la 17978 salvaje, tanto en luz, como en oscuridad (Tabla 6.1).

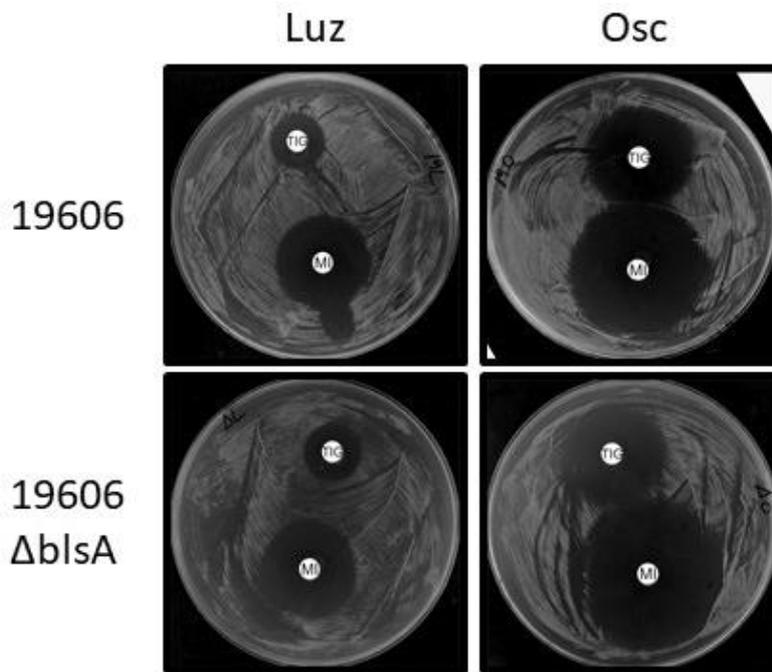


Figura 6.11. Antibiograma que muestra los halos de inhibición de la cepa ATCC 19606 salvaje y la mutante en el fotorreceptor *blsA* en luz y oscuridad para los antibióticos MIN y TIG en LB a 24° C.

Tabla 6.1. Diámetro del halo de inhibición del crecimiento en placas de LB para las cepas ATCC 19606, ATCC 19606 $\Delta blsA$, ATCC 17978 y ATCC 17978 $\Delta blsA$ con los antibióticos MIN y TIG.

	MIN	TIG	Fuente
	LB	LB	
ATCC 19606			ATCC
Luz azul	30 ± 1	18 ± 1	
Oscuridad	44 ± 1	30 ± 1	
ATCC 19606 $\Delta blsA$			Este trabajo.
Luz azul	29 ± 1	17 ± 1	
Oscuridad	44 ± 1	30 ± 1	
ATCC 17978			ATCC
Luz azul	31 ± 1	16 ± 1	
Oscuridad	37 ± 1	23 ± 1	
ATCC 17978 $\Delta blsA$			Mussi y col. (2010)
Luz azul	31 ± 1	16 ± 1	
Oscuridad	37 ± 1	23 ± 1	

Esto indica que la modulación por luz de la susceptibilidad a antibióticos es independiente de la presencia de la proteína BlsA, y por lo tanto este fotorreceptor proteico no es el responsable del fenotipo observado.

6.2.2.2. El 1O_2 gatilla la reducción en la susceptibilidad a MIN y TIG en *A. baumannii*.

Se ha reportado que la luz puede modular la expresión génica en *Myxococcus xanthus* independientemente de la presencia de fotorreceptores bacterianos tradicionales (Galbis-Martínez et al. 2012; Ortiz-Guerrero et al. 2011). Uno de los mecanismos que utiliza esta bacteria está mediado por 1O_2 , el cual se produce como resultado de la excitación de la

protoporfirina IX por absorción de la luz azul (Galbis-Martínez et al. 2012). El $^1\text{O}_2$ constituye una de las especies reactivas del oxígeno o ROS (del inglés Reactive Oxigen Species) que son capaces de causar daño en diversas biomoléculas tales como membranas, proteínas y ADN, hasta causar la muerte celular [123], [124]. Por un mecanismo aún desconocido, el $^1\text{O}_2$ generado interactúa con una proteína anti-anti-sigma, provocando que el factor sigma se libere de la membrana. Posteriormente, se une a la ARN polimerasa y se activa la transcripción de diversos genes incluyendo los que codifican por carotenoides, que protegen a la célula de las ROS (Galbis-Martínez et al. 2012).

El azul de metileno es un colorante que absorbe luz roja ($\lambda = 700\text{nm}$), pero no luz azul ($\lambda = 570\text{nm}$), ya que su rango de absorción es entre 550nm y 700nm [125], [126]. Este compuesto se utilizó para generar $^1\text{O}_2$ a partir de oxígeno molecular (O_2) y luz roja (Galbis-Martínez et al. 2012; Berghoff et al. 2009). De este modo se hicieron ensayos para evaluar si el $^1\text{O}_2$ puede participar en la fotorregulación de la susceptibilidad a antibióticos.

Cuando la bacteria se irradió con luz roja se observaron halos de inhibición del crecimiento similares a los observados cuando se incubó en oscuridad (Figura 6.12). Sin embargo, la aplicación conjunta de azul de metileno y luz roja resultó en una importante reducción de los diámetros de inhibición (Figura 6.12, Tabla 6.2), dando valores similares a aquellos observados en condiciones de iluminación con luz azul (Figura 6.1 y Tabla 6.1).

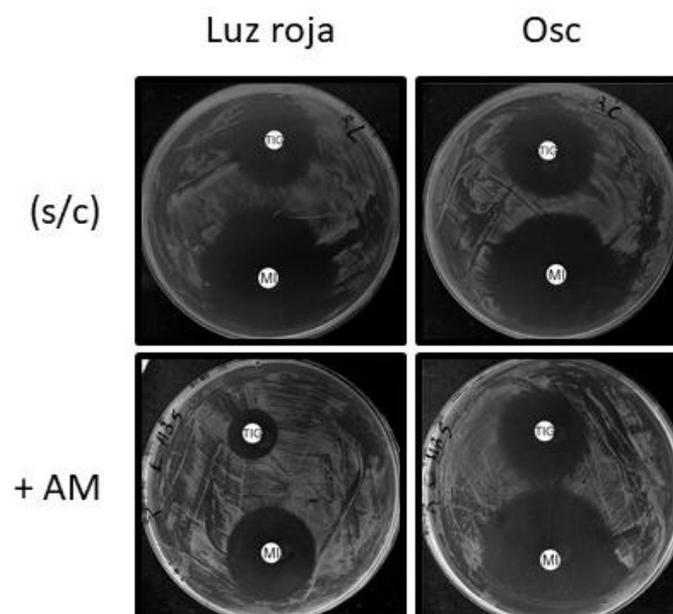


Figura 6.12. Susceptibilidad a MIN y TIG para la cepa ATCC 19606 expuesta a la luz roja o incubada en oscuridad con el agregado de azul de metileno al medio (+AM) o sin el agregado (s/c).

Tabla 6.2. Diámetro de las zonas de inhibición por MIN y TIG del crecimiento de la cepa ATCC 19606 incubada en condiciones de luz roja o de oscuridad, frente al agregado de azul de metileno o sin él.

Compuesto agregado	Luz	MIN	TIG
Sin agregado	Roja	42 ± 1	28 ± 1
	Oscuridad	41 ± 1	30 ± 1
Azul de metileno	Roja	30 ± 1	16 ± 1
	Oscuridad	42 ± 1	26 ± 1

Estos resultados indican que la susceptibilidad disminuida de las bacterias en presencia de luz azul podría estar mediada por $^1\text{O}_2$.

6.2.2.3. La presencia de $^1\text{O}_2$ induce la expresión de las bombas de eflujo AdeABC y AdeIJK.

Para evaluar si el $^1\text{O}_2$ es capaz de modular la expresión de los genes que codifican para las bombas de eflujo se hicieron ensayos de RT-qPCR. Para esto, se recolectaron células de la cepa A42 crecidas a 24° C y en luz roja con o sin azul de metileno agregado al medio o en oscuridad.

En la figura 6.13 se puede ver que los niveles de expresión de los componentes de la bomba de eflujo *adeABC* fueron mayores en luz roja con azul de metileno, que en oscuridad.

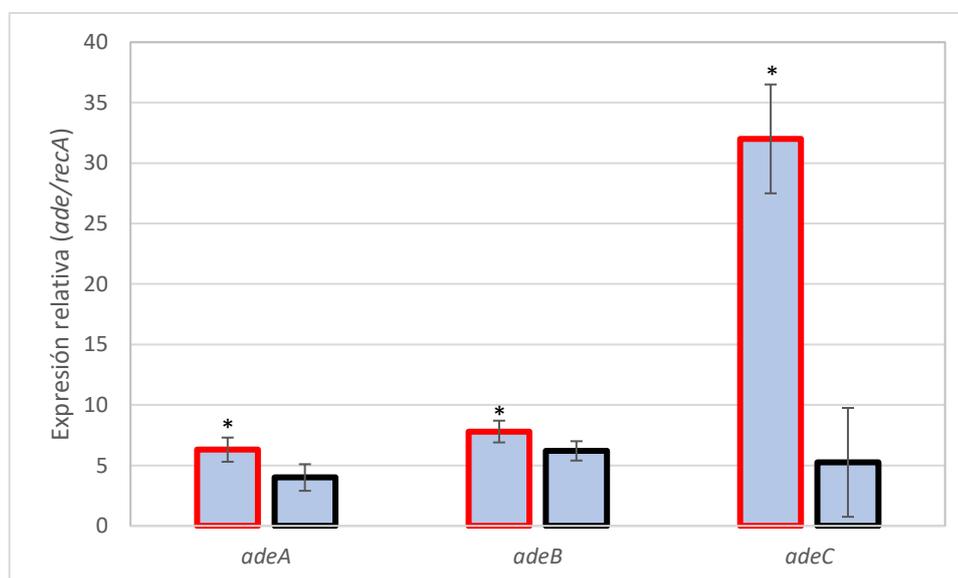


Figura 6.13. Efecto de la acción conjunta entre la luz roja y el azul de metileno en la expresión de los transcritos *adeABC* en células de A42 incubadas a 24° C. Las barras de color celeste indican agregado de azul de metileno al medio. Las barras con contorno rojo indican exposición a luz roja, mientras que las barras con contorno negro indican condiciones de oscuridad. Los asteriscos indican valores estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

En la figura 6.14 se puede ver que los niveles de expresión de genes que codifican por ciertos componentes de la bomba de eflujo AdeIJK son inducidos por el azul de metileno en presencia de luz roja.

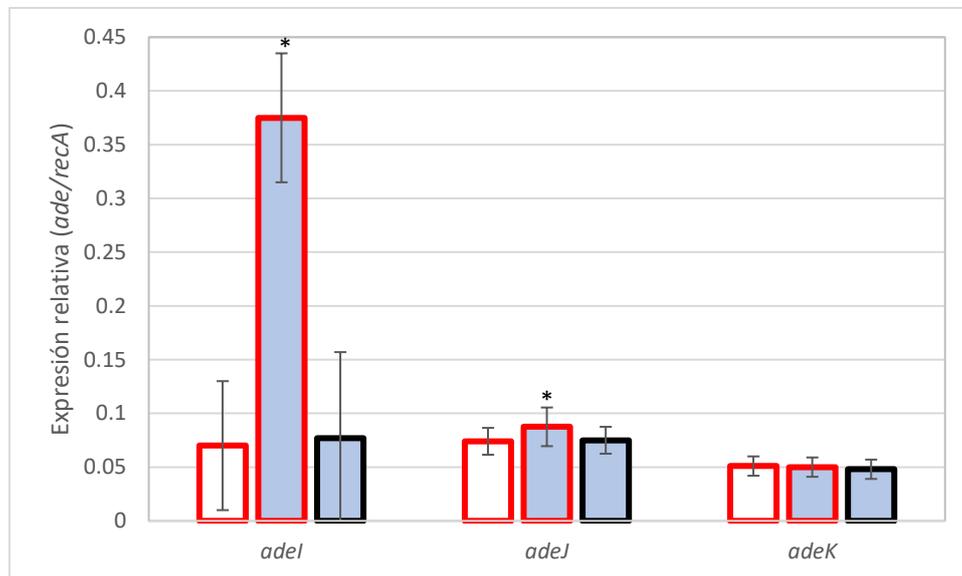


Figura 6.14. Efecto de la acción conjunta entre la luz roja y el azul de metileno en la expresión de los transcritos *adeIJK* en células de A42 incubadas a 24° C. Las barras blancas indican incubación sin el agregado de azul de metileno. Las barras de color celeste indican con el agregado del azul de metileno. Las barras con contorno rojo indican exposición a luz roja, mientras que las barras con contorno negro indican oscuridad. Los asteriscos indican valores estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

Estos resultados indican que la presencia de 1O_2 , generado mediante la aplicación simultánea de azul de metileno y luz roja, induce la expresión de genes que codifican por componentes de las bombas de eflujo AdeABC y AdeIJK.

6.2.2.4. Discusión

El 1O_2 es una de las especies reactivas del oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) que puede generarse por reducción parcial durante el metabolismo del oxígeno molecular. Este puede generar importantes daños al ADN y otras macromoléculas, por lo que se puede entender que su presencia en el interior de la célula genere una respuesta. Además, como se mencionó anteriormente, también se produce como resultado de la excitación de la protoporfirina IX por absorción de la luz azul (Galbis-Martínez et al. 2012).

Esto indica que el 1O_2 es un punto donde convergen dos cascadas de señalización independientes generadas por dos señales ambientales: el O_2 del aire y la luz. A través de este compuesto, la célula es capaz de integrar estas señales, lo que le indica que se

encuentra fuera del hospedador, en un ambiente expuesto, y que debe competir con otros microorganismos, así como también resistir a diversos agentes que pueden dañarla.

En el sentido de los resultados obtenidos en esta sección, el $^1\text{O}_2$ es capaz de modular la expresión de ciertos componentes de las bombas de eflujo AdeABC y AdeIJK.

Se ha reportado que estas bombas de eflujo no solo tienen la capacidad de expulsar de la célula ciertas moléculas con actividad antibiótica, sino que además pueden hacerlo con otros compuestos dañinos, como ciertos colorantes y detergentes [121].

Una característica en común que tienen todos los compuestos expulsados por estas bombas de eflujo es que son dañinos para las células o incluso amenazan su supervivencia. Así, puede comprenderse la convergencia de las señales de la luz y el O_2 en el $^1\text{O}_2$ y que este a su vez active la transducción de ciertos genes que codifican por las bombas de eflujo AdeABC y AdeIJK, logrando expulsarlo con un efecto sinérgico.

6.3. Conclusiones.

En este capítulo se demostró que la susceptibilidad a los antibióticos MIN y TIG está modulada por luz en *A. baumannii*.

También se demostró que hay una correlación entre la reducción en la susceptibilidad a MIN y TIG inducida por luz y la inducción de la expresión de genes de bombas de eflujo. Esto sugiere que estas bombas de eflujo serían las responsables de la expulsión de dichos antibióticos del interior celular y por consiguiente de la reducción en la susceptibilidad.

También demostramos que esta modulación por luz no depende de BlsA, el único fotorreceptor proteico clásico encontrado en el genoma de *A. baumannii*, sino que es probable que en analogía a *Myxococcus xanthus* dependa de alguna molécula fotosensible que al absorber luz azul sea capaz de excitarse y transmitir la señal, vía $^1\text{O}_2$ (Galbis-Martínez et al. 2012; Ortiz-Guerrero et al. 2011).

En el caso de *A. baumannii*, sucedería lo mismo. El $^1\text{O}_2$ llevaría a la activación de los genes de resistencia tales como aquellos que codifican por la bomba de eflujo AdeABC y AdeIJK y también del regulador transcripcional AdeN.

*Utilización del malato
como fuente de energía
en 'Candidatus
Phytoplasma' Aster
Yellows Witches'-Broom*

7. Utilización del malato como fuente de energía en '*Candidatus Phytoplasma*' Aster Yellows Witches'-Broom.

7.1. Introducción

Como se mencionó en la introducción general, los fitoplasmas (*Candidatus Phytoplasma*) son patógenos de plantas que se transmiten a través de insectos vectores del orden Hemiptera. Producen efectos devastadores en un amplio rango de cultivos tanto de alto como de bajo interés agronómico alrededor del mundo, tales como coco, vid, manzana, maíz, zanahoria, repollo y cebolla [28], [36], [38], [45], [128]. La mayoría de los síntomas causados por las infecciones con estos microorganismos son compatibles con el agotamiento de los recursos nutricionales del hospedador [129].

El análisis de los genomas secuenciados mostró la ausencia de numerosas vías clásicas de utilización de fuentes de carbono y generación de energía [31]. No poseen sistema de la fosfotransferasa (PTS) para la importación de azúcares, ni hexoquinasa para la generación de glucosa 6-fosfato para alimentar la glicólisis. La posesión de un gen que codifique para una sacarosa fosforilasa completa, la cual compensaría la ausencia de la hexokinasa y del PTS no es una característica general en fitoplasmas [31], [130]. No todos los fitoplasmas tienen una vía glucolítica funcional. Además, carecen de los conjuntos de genes para la biosíntesis de esteroides, ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), síntesis *de novo* de nucleótidos y aminoácidos, ATP sintasas y una vía de las pentosas fosfato completa. [31], [130]. Estas deficiencias resultan en una fuerte dependencia de los recursos nutricionales del hospedador [131]. En este sentido, es importante mencionar que no han podido ser identificados factores de virulencia tradicionales en los genomas de estos microorganismos.

Sin embargo, un rasgo común presente en todos los fitoplasmas cuyos genomas han sido secuenciados hasta el momento es la presencia de genes que codifican para una enzima málica (EM) putativa y genes que codifican para proteínas implicadas en el transporte del malato. En '*Candidatus Phytoplasma*' Aster Yellows Witches'-Broom (AYWB) la EM putativa está codificada en el marco abierto de lectura AYWB_051 (Bai et al. 2006;

accession number: NC_007716) (Figura 7.1). Este gen está localizado de manera inmediatamente adyacente en sentido 5' de AYWB_052, que codifica para un simportador putativo malato-sodio (CitS). Ambos genes están orientados cabeza-cola, sugiriendo que pueden formar parte de un mismo operón y estar co-regulados.

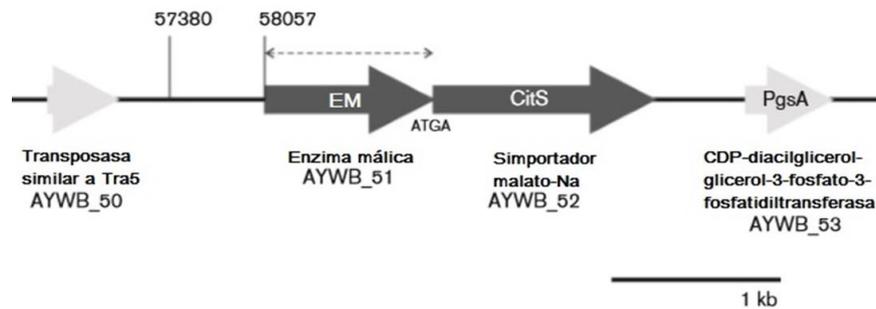


Figura 7.1. Organización genética del loci cromosómico de 'Ca. P. asteris' AYWB que contiene el gen que codifica para la EM y las regiones flanqueantes. La línea discontinua indica la región codificante clonada en el vector de expresión.

Se propone entonces que esta vía podría estar operando en la generación de energía en forma de ATP y poder reductor, en la que el malato, uno de los ácidos orgánicos más abundantes en el floema [25], [31], [130], se utilizaría como fuente de carbono mediante su conversión a acetato [31], [130] (Figura 7.2). Específicamente, el malato podría ser tomado del medio por el simportador CitS, luego convertido a piruvato por la enzima málica (EM), de piruvato a acetil-CoA por el complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDHC), de acetil-CoA a acetil-fosfato (acetil-P) por una fosfotransacetilasa (PTA) y finalmente de acetil-P a acetato por una acetato kinasa (ACK).

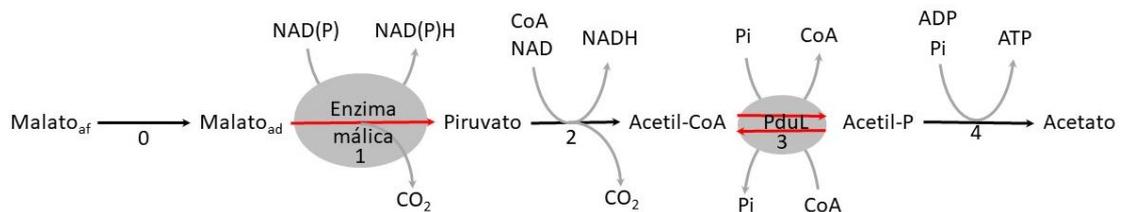


Figura 7.2. Vía propuesta para la utilización de malato en fitoplasmas AYWB. La vía incluye el transporte de malato desde el ambiente (af=afuera) al citosol (ad=adentro), llevado a cabo por un simportador malato-Na (CitS, paso 0); la conversión de malato a piruvato por la enzima málica (EM, paso 1); piruvato a acetil-CoA por el complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDHC, paso 2); acetil-CoA a acetil-fosfato (acetil-P) por una fosfotransacetilasa (PduL, paso 3) y finalmente acetil-P a acetato por una acetato kinasa (ACK, paso 4).

Sin embargo, el gen para una PTA está ausente en su genoma, por lo que se propone que la enzima PduL (proteína de utilización de propanodiol) [132] podría compensar esta ausencia de PTA [130]. Esta posibilidad surge ya que se ha reportado que la PduL posee

actividad PTA en la vía de degradación de 1,2-propanodiol dependiente de B12 de *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* LT2 [132]. Análisis cinéticos de esta enzima mostraron que cataliza la conversión de propionil-fosfato a propionil-CoA y en menor medida, acetyl-P a acetyl-CoA [132].

Esta hipótesis presenta a las EM putativas codificadas en los genomas de fitoplasma como posibles factores de virulencia ya que serían fundamentales para el éxito del patógeno en el hospedador [31], [130].

En este trabajo de tesis se analizaron aspectos cinéticos y estructurales de la EM y la PduL del fitoplasma AYWB para detectar características que ayuden a entender sus roles en el metabolismo del fitoplasma.

7.2. Resultados y discusión.

7.2.1. Caracterización cinética y regulación metabólica de la EM-AYWB.

En nuestro grupo de trabajo se estimó que la masa monomérica de la EM de AYWB recombinante expresada heterológamente en *E. coli* y purificada es de aproximadamente 44kDa [133]. Esta masa molecular se corresponde con la predicha, en base a la secuencia de la EM-AYWB. La masa molecular nativa de EM-AYWB se determinó por cromatografía de exclusión molecular. El valor obtenido (76.0 ± 9.9 kDa) indica que la EM-AYWB se ensambla en forma de dímero, consistentemente con otras EMs que también se ensamblan de esta manera [134].

7.2.1.1. Caracterización cinética de la reacción catalizada por EM-AYWB en presencia de NAD.

Cuando se hicieron medidas de actividad de la EM-AYWB utilizando L-malato como sustrato y en presencia de los cofactores NAD o NADP y con Mn^{2+} o Mg^{2+} , se vio que esta enzima posee actividad para la descarboxilación oxidativa del malato presentando actividad máxima a un valor de pH de 8,2 (Figura S1, Saigo et al. 2014).

Luego, se realizaron estudios cinéticos en presencia de NAD- Mn^{2+} o NADP- Mg^{2+} , condiciones típicas para las medidas de actividad de las EM dependientes de NAD/NADP [61], [134] al pH óptimo (8,2).

Como se puede ver en la Figura 7.3 y Tabla 7.1, cuando se midió la actividad de la EM dependiente de NAD con concentraciones variables de este cofactor (de 0,01 mM a 2,5

mM), y a una baja concentración de malato (0,09 mM), los valores obtenidos se ajustaron a una curva sigmoidea acorde a la ecuación de Hill con un $n > 1$. Cuando se usó una alta concentración de malato (30 mM) los valores se ajustaron a una curva hiperbólica acorde a la ecuación de Michaelis-Menten.

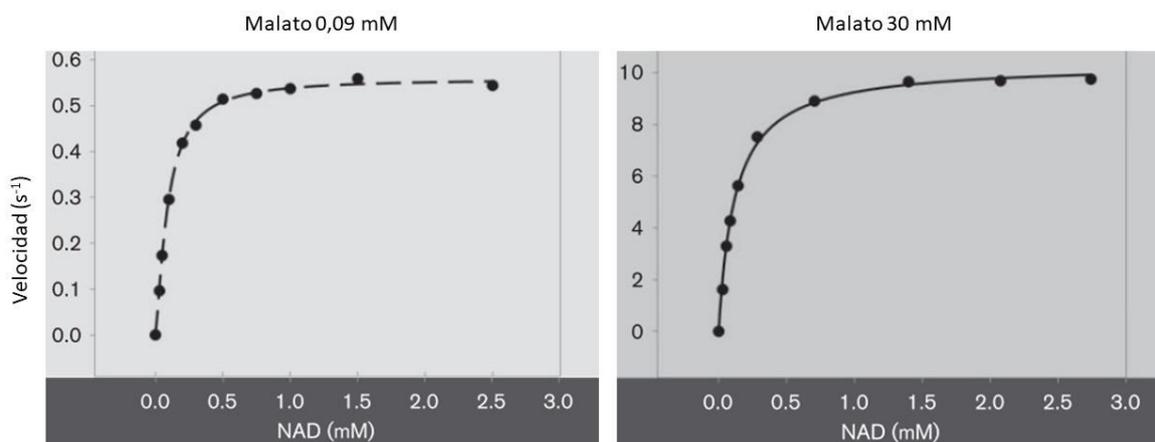


Figura 7.3. Curvas de saturación típicas para la actividad de EM-AYWB. Se determinó la actividad de la EM dependiente de NAD a una concentración de malato fija baja (0,09 mM) o alta (30 mM) y a varias concentraciones de NAD. Las curvas de saturación se ajustaron a los modelos de las ecuaciones de Michaelis-Menten (líneas continuas) o Hill (líneas de segmentos largos) y los parámetros cinéticos estimados obtenidos con la ecuación que mejor ajustó se indican en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1. Parámetros cinéticos de la EM-AYWB recombinante dependiente de NAD.

Concentración fija de malato			
Malato 0,09mM (ss)		Malato 30mM (cs)	
K_{NAD}^* (mM)	V_{max} (s^{-1})	$K_{NAD}^{\#}$ (mM)	V_{max} (s^{-1})
$0,09 \pm 0,003$	$0,56 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$	$10,4 \pm 0,11$

Concentración fija de NAD			
NAD 0,1mM (ss)		NAD 1,5mM (cs)	
$K_{malato}^{\#}$ (mM)	V_{max} (s^{-1})	$K_{malato}^{\$}$ (mM)	V_{max} (s^{-1})
$1,60 \pm 0,20$	$5,36 \pm 0,22$	$3,67 \pm 0,61$	$15,3 \pm 1,21$

Se determinó la actividad enzimática a varias concentraciones de un sustrato y concentraciones fijas del otro (L-malato 0,09 o 30mM; NAD 0,1 o 1.5mM) a un pH óptimo de 8,2. (ss) indica concentraciones subsaturantes. (cs) indica concentraciones cercanas a las saturantes. Los parámetros cinéticos se estimaron ajustando las medidas a las ecuaciones de Michaelis-Menten, Hill o modelo de dos sitios. $*S_{0,5}$ (ecuación de Hill, $n_H = 1.36 \pm 0,05$). $\#K_m$ (ecuación de Michaelis-Menten). $\#S_{0,5}$ (ecuación de Hill, $n_H = 1.42 \pm 0,25$). $\$K_1$ (ecuación del modelo de dos sitios).

Posteriormente, se realizaron curvas de saturación de malato realizadas con concentraciones variables de este sustrato (desde 0,23 mM a 37 mM). Cuando se realizaron con una baja concentración de NAD (0,1 mM) se ajustaron a una curva sigmoidea de acuerdo a la ecuación de Hill ($n > 1$). Cuando se realizaron con una alta concentración de NAD

(1,5 mM) se ajustaron a una ecuación polinómica racional 2:2 (ecuación de dos sitios; [62] (Tabla 7.1, Figura 7.4).

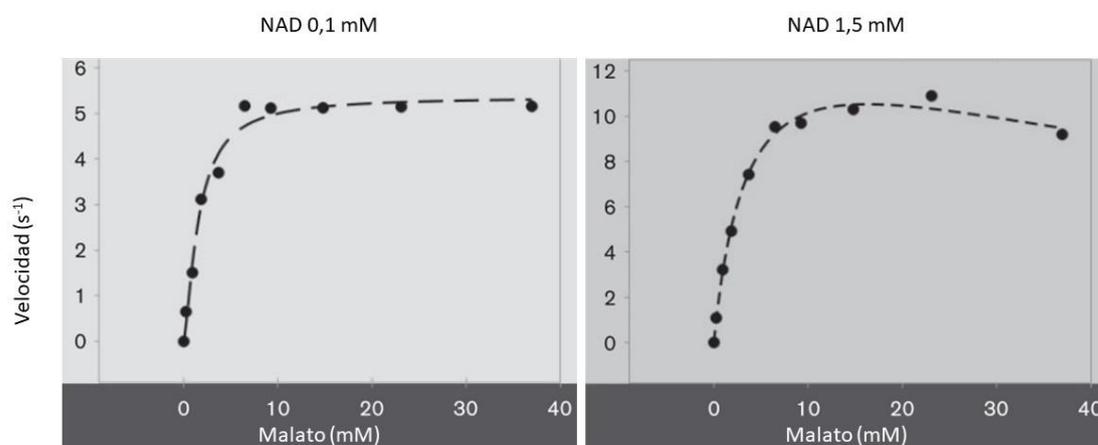


Figura 7.4. Curvas de saturación típicas para la actividad de EM-AYWB dependiente de NAD a diferentes concentraciones de sustrato. Se determinó la actividad de la EM dependiente de NAD a varias concentraciones de malato y a una concentración de NAD fija baja (0,1 mM) o alta (1,5 mM). Las curvas de saturación se ajustaron a los modelos de las ecuaciones de Hill (líneas de segmentos largos) o de dos sitios (líneas de segmentos cortos) y los parámetros cinéticos estimados obtenidos con la ecuación que mejor ajustó se indican en la Tabla 7.1.

Los resultados indican que el malato inhibe la reacción cuando está presente en altas concentraciones, posiblemente porque la EM de AYWB en su mecanismo de reacción podría unir primero el NAD, aunque no se puede descartar la presencia de un sitio de unión alostérico para el malato.

7.2.1.2. Caracterización cinética de la EM-AYWB dependiente de NADP.

Como se puede ver en la Figura 7.5, cuando se midió la actividad de la EM en presencia de NADP variando la concentración de malato de 0,2 mM a 32 mM, y a una baja concentración de NADP (0,05 mM), las curvas de saturación de malato se ajustaron a una hipérbola de acuerdo con la ecuación de Michaelis-Menten. Cuando se usó una alta concentración de NADP (2,3 mM) los valores obtenidos se ajustaron a una ecuación polinómica racional 2:2 (Tabla 7.2, Figura 7.5).

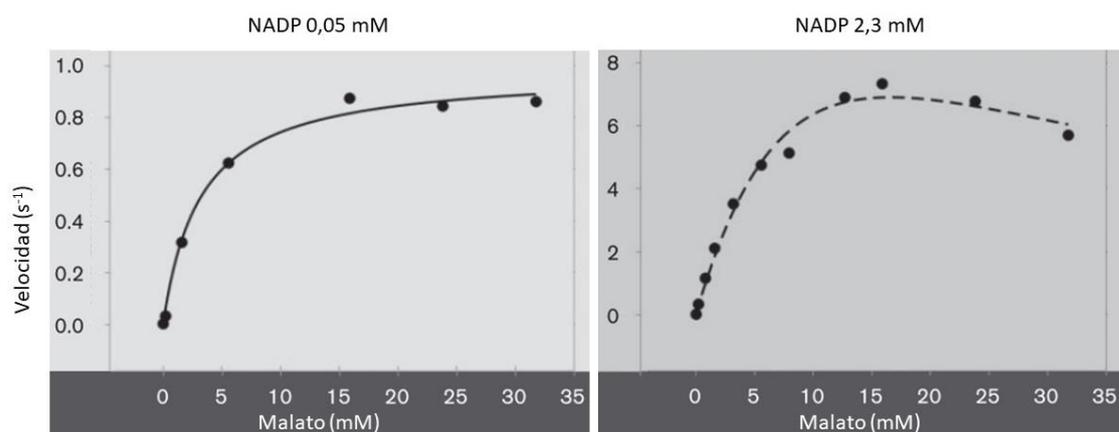


Figura 7.5. Curvas de saturación típicas para la actividad de EM-AYWB dependiente de NADP a diferentes concentraciones de sustrato. Se determinó la actividad de la EM dependiente de NADP a varias concentraciones de malato y a una concentración de NADP fija baja (0,05 mM) o alta (2,3 mM). Las curvas de saturación se ajustaron a los modelos de las ecuaciones de Michaelis-Menten (líneas continuas) o de dos sitios (líneas de segmentos cortos) y los parámetros cinéticos estimados obtenidos con la ecuación que mejor ajustó se indican en la Tabla 7.2.

Tabla 7.2. Parámetros cinéticos de la EM-AYWB recombinante dependiente de NADP.

Concentración fija de malato			
Malato 0,2mM (ss)		Malato 30mM (cs)	
K_{NADP}^{\S} (mM)	V_{max} (s^{-1})	K_{NADP}^{\S} (mM)	V_{max} (s^{-1})
$0,20 \pm 0,12$	$0,25 \pm 0,10$	$0,23 \pm 0,10$	$3,78 \pm 0,85$

Concentración fija de NADP			
NADP 0,05mM (ss)		NADP 2,3mM (cs)	
$K_{malato}^{\#}$ (mM)	V_{max} (s^{-1})	K_{malato}^{\S} (mM)	V_{max} (s^{-1})
$3,19 \pm 0,47$	$0,98 \pm 0,03$	$15,6 \pm 8,97$	$19,9 \pm 8,53$

Se determinó la actividad enzimática a varias concentraciones de un sustrato y concentraciones fijas del otro (L-malato 0,2 o 30 mM; NADP 0,05 o 2,3mM) a un pH óptimo de 8,2. (ss) indica concentraciones subsaturantes. (cs) indica concentraciones cercanas a saturantes. Los parámetros cinéticos se estimaron ajustando las medidas a las ecuaciones de Michaelis-Menten o modelo de dos sitios. $^{\#}K_m$ (ecuación de Michaelis–Menten). $^{\S}K_1$ (ecuación del modelo de dos sitios).

Sin embargo, en contraste con lo que ocurre con el NAD, las curvas de saturación de NADP no fueron hiperbólicas ni a bajas, ni a altas concentraciones de malato (0,2 mM y 30 mM respectivamente) (Tabla 7.2 y Figura 7.6).

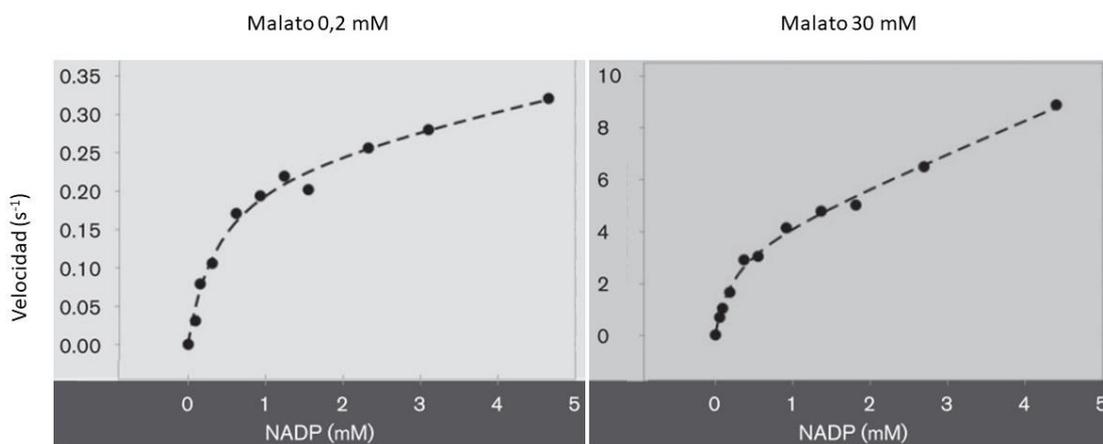


Figura 7.6. Curvas de saturación típicas para la actividad de EM-AYWB. Se determinó la actividad de la EM dependiente de NADP a una concentración de malato fija baja (0,2 mM) o alta (30 mM) y a varias concentraciones de NADP. Las curvas de saturación se ajustaron a los modelos de las ecuaciones de dos sitios (líneas de segmentos cortos) y los parámetros cinéticos estimados obtenidos con la ecuación que mejor ajustó se indican en la Tabla 7.2.

En su lugar, ambos conjuntos de valores se ajustaron a un polinomio racional 2:2, el cual se puede interpretar como un modelo de unión de dos sitios con un efecto activador cuando ocurre la unión de la segunda molécula de NADP. En este caso, los datos sugieren que la EM adopta un mecanismo de regulación alostérica en presencia de NADP.

7.2.1.3. Regulación metabólica de la EM-AYWB dependiente de NAD/NADP.

Para evaluar la respuesta de la EM-AYWB a diferentes intermediarios metabólicos, posiblemente relevantes para la modulación de la actividad en la planta hospedadora, se midió la actividad de la EM en concentraciones subsaturantes de los sustratos: 2 mM de malato; 0,05 mM de NAD; 0,08 mM de NADP, en presencia de diferentes intermediarios metabólicos y en dos concentraciones diferentes.

Los resultados indicaron que la actividad de la EM dependiente de NAD se incrementó en presencia de los aminoácidos glutamato, glutamina, aspartato y glicina (Figura 7.7).

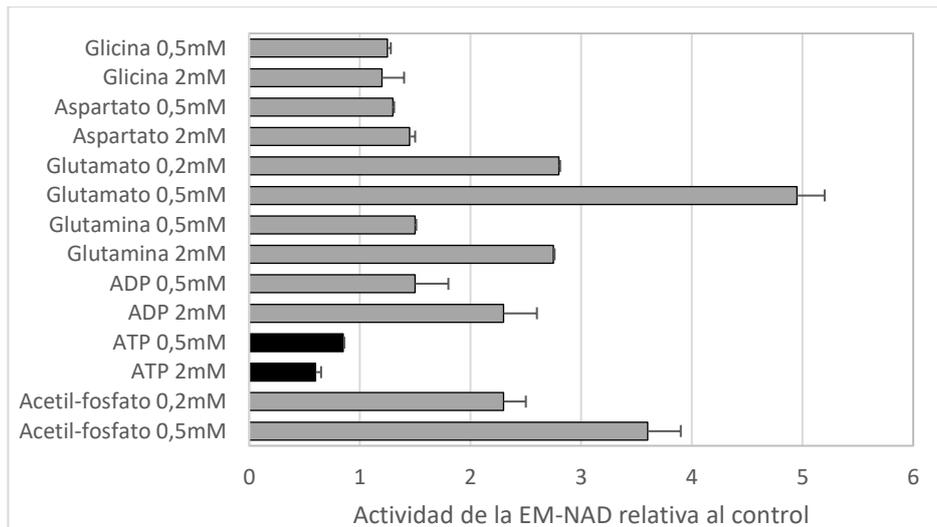


Figura 7.7. Propiedades regulatorias de la EM-AYWB. La actividad de la EM-AYWB dependiente de NAD se midió a pH 8,2 en ausencia o presencia de los efectores indicados. La actividad medida en presencia de cada efector se expresa de forma relativa a la actividad medida en su ausencia. Los efectos inhibitorios se indican con negro (relación menor a 1) y los efectos activadores se indican en gris (relación mayor a 1).

El mayor incremento de la actividad (casi 5 veces respecto del control) se obtuvo en presencia de glutamato 0,5 mM, mientras que la glutamina 0,5 mM y el aspartato 0,5 mM aumentaron la actividad de la EM en un factor de 1,5 y 1,3 veces respectivamente. En presencia de ADP 0,5 mM y acetil-P, la actividad de la EM se incrementó 1,6 y 3,5 veces respectivamente. Sin embargo, una concentración de 2 mM de ATP produjo una disminución de la actividad de la enzima en un 40%. El succinato, fumarato, citrato, acetil-CoA, CoA, glucosa 6-fosfato y acetato no produjeron un efecto significativo en la actividad de la EM en presencia de NAD.

Cuando se repitieron los ensayos en presencia de NADP (Figura 7.8) los resultados indicaron que de todos los aminoácidos solo el glutamato y la glutamina produjeron un incremento en la actividad de la enzima (3 y 1,3 veces respectivamente, en una concentración de 2 mM de cada metabolito). En presencia de ADP y acetil-P (2 mM cada uno), la actividad de la enzima se incrementó casi 6 y 5 veces respectivamente, mientras que el ATP en una concentración de 2 mM produjo un efecto inhibitorio. Al igual que en la reacción dependiente de NAD, el succinato, fumarato, citrato, acetil-CoA, CoA, glucosa 6-fosfato y acetato no produjeron un efecto significativo en la actividad de la EM en presencia de NADP.

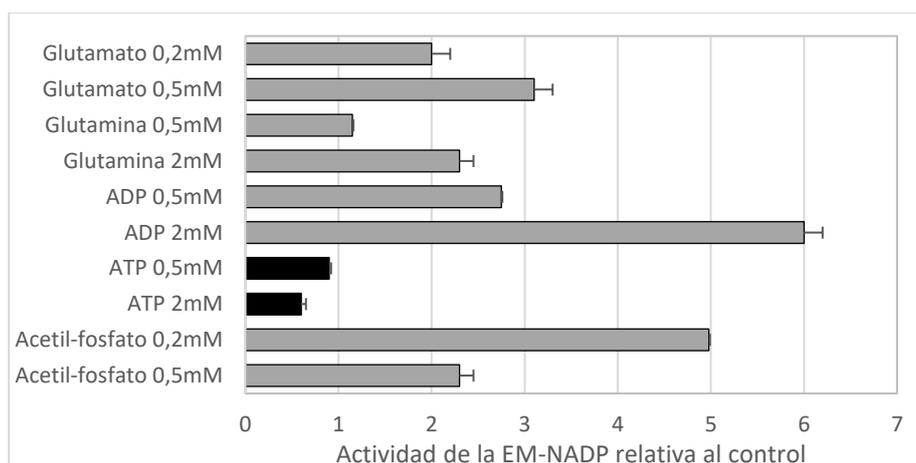


Figura 7.8. Propiedades regulatorias de la EM-AYWB. La actividad de la EM-AYWB dependiente de NADP se midió a pH 8,2 en ausencia o presencia de los efectores indicados. La actividad medida en presencia de cada efector se expresa de forma relativa a la actividad medida en su ausencia. Los efectos inhibitorios se indican con negro (relación menor a 1) y los efectos activadores se indican en gris (relación mayor a 1).

7.2.1.4. Importancia del residuo Tirosina-36 en la catálisis de la EM-AYWB.

Hasta la fecha, se han reportado tres estructuras moleculares de EMs. La EM-NAD(P) mitocondrial humana [135], la EM-NADP citosólica hepática de paloma [136] y la EM-NAD mitocondrial del nemátodo *Ascaris suum* [137]. Estas tres han sido caracterizadas y muestran diferentes especificidades de sustrato, propiedades cinéticas y regulación alostérica. Sin embargo, sus estructuras tridimensionales son muy similares, incluso se vio que adoptan la misma organización tetramérica, la cual se puede describir como un dímero de dímeros.

En nuestro grupo de trabajo se pudo cristalizar y resolver la estructura cristalográfica de la EM-AYWB en presencia de $MgCl_2$ y NAD (Figura 7.10) [59].

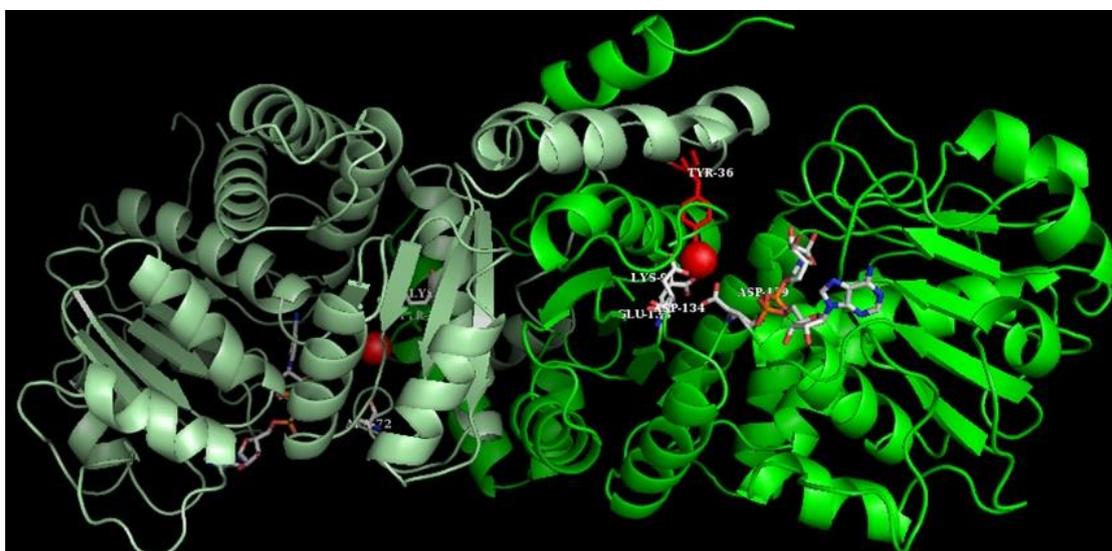


Figura 7.10. Estructura cristalográfica de la EM-AYWB obtenida por nuestro grupo de trabajo.

A partir de esta, se vio que los dos monómeros que la forman están unidos a través de una gran interfase. La asociación entre los monómeros en esa superficie no solo forma un dímero estable, sino que también contribuye al ensamblado del sitio activo.

Aunque existe una interacción entre las superficies de los dímeros en las estructuras tetraméricas de todas las EMs mencionadas, ninguna de ellas tiene una configuración de dimerización como la que se ve en EM-AYWB. La EM-AYWB tiene aproximadamente 85% más de residuos involucrados en la interfase del dímero que la EM de humanos. Por lo tanto, se propone que la estabilidad del dímero de la EM-AYWB es aproximadamente cuatro veces mayor en términos energéticos comparada con la EM de humanos. Además, su configuración tridimensional es absolutamente nueva y no se ha reportado previamente para ninguna otra EM.

En este sentido, vale mencionar que todos los residuos que se reportó que están comprometidos en el sitio activo de la EM humana están conservados en la EM-AYWB: Tirosina-36, Lisina-91, Glutamato-133, Aspartato-134 y Aspartato-159 (Figura 7.11). Sin embargo y sorprendentemente, solo en la enzima bacteriana, en cada uno de los sitios activos del dímero, la Tirosina-36 (Tyr36) es aportada por el otro monómero (Figura 7.10 y 7.11).

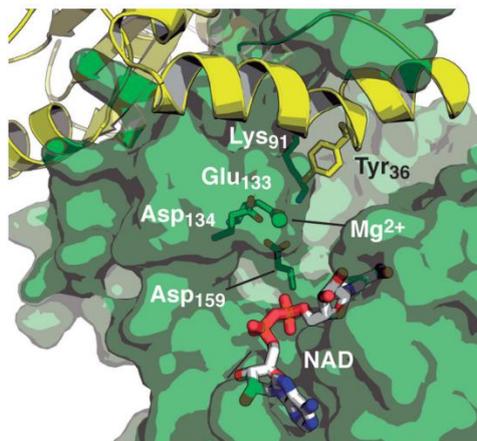


Figura 7.11. Vista del sitio activo de la EM-AYWB donde se ven los residuos altamente conservados que lo forman. El sitio activo representado pertenece a uno de los monómeros (color verde), aunque se puede apreciar como el residuo de Tyr36 es aportado por el "brazo" del otro monómero (coloreado en amarillo).

La estructura cristalográfica de la EM-AYWB muestra la EM más pequeña que se ha caracterizado hasta ahora. Un dominio de EM-AYWB, mayormente helicoide adopta una

configuración que se parece a un brazo que se apoya sobre el otro monómero y contribuye a la formación de su sitio activo. Esta contribución al centro de reacción es a través del residuo Tyr36 del brazo, cuya posición es crítica.

Debido a esta conformación novedosa del sitio activo adoptado por la EM-AYWB, se quiso evaluar la importancia del residuo Tyr36 para la actividad catalítica de esta enzima. Para ello, se generó una EM con una mutación puntual en dicha posición, reemplazando el residuo de Tirosina por uno de Alanina (Ala). Tal como se hizo para la EM salvaje, la EM mutante (EM-Y36A) generada se expresó heterológamente, se purificó y luego se hicieron ensayos de actividad.

A pesar de haber utilizado varias concentraciones diferentes de sustratos y cofactores y en condiciones alternativas de pH, no se pudo detectar actividad catalítica de la EM-Y36A.

La falta de actividad catalítica puede deberse a un impedimento en la dimerización, por lo que se hizo un ensayo de cromatografía de exclusión molecular y se vio que tanto la EM salvaje como la EM-Y36A se comportan como dímeros estables en solución, con una masa molecular de 79 ± 5 kDa y no muestran diferencias significativas en su espectro de dicroísmo circular (Figura 7.12).

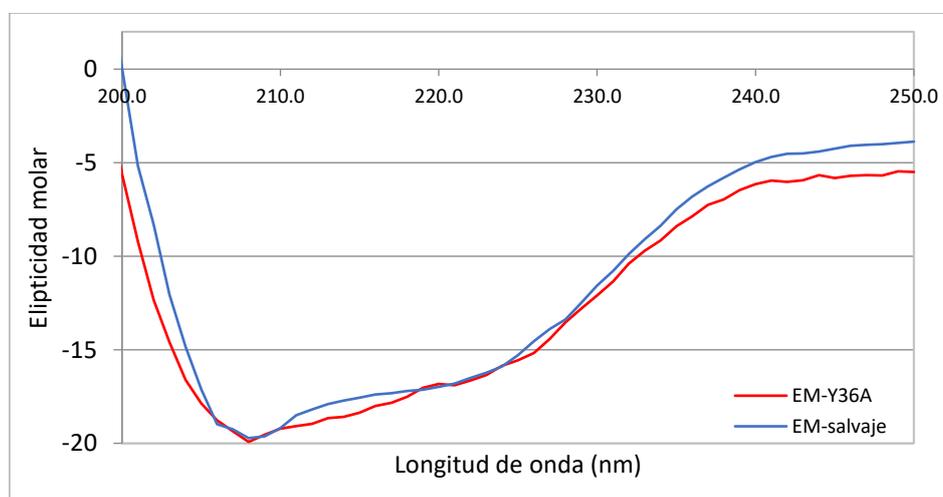


Figura 7.12. Espectro de dicroísmo circular para las EM-AYWB salvaje y mutante Y36A.

7.2.1.5. Discusión.

En este trabajo se demostró que la EM-AYWB exhibe interacciones únicas y complejas con sus sustratos, mostrando un comportamiento cinético diferencial dependiendo de la concentración relativa del malato con respecto al NAD(P) (Figura 7.3 a 7.6, Tabla 7.1 y 7.2). Además, se puede ver un comportamiento cinético diferente incluso cuando se compara al

NAD con el NADP, sugiriendo que estos cofactores pueden desencadenar una respuesta diferencial de la EM, probablemente debido a la unión a sitios alostéricos específicos.

Por otro lado, no se han encontrado sistemas de dos componentes que sirvan para regular la utilización del malato en fitoplasmas, como sí se han encontrado en firmicutes, tales como *Enterococcus faecalis* [138]. Esto indica que los fitoplasmas utilizan otras estrategias para regular la utilización de este azúcar.

En este sentido, la inhibición de la EM-AYWB a elevadas concentraciones de malato, sería una potencial estrategia para evitar una acumulación excesiva de acetato, el cual puede ser tóxico para las células. Tal inhibición puede estar mediada a través de sitios alostéricos para el malato. Además, la actividad de la EM-AYWB también está modulada por varios metabolitos relevantes, incluyendo aminoácidos, acetil-fosfato, ATP y ADP, (Figuras 7.7 y 7.8). La regulación de la EM por el estado energético, reflejado en la relación ATP/ADP puede deberse a que el papel principal de la EM-AYWB es proporcionar piruvato a la vía del malato para generar energía.

Los genes que codifican para la EM, así como también para otras enzimas que constituyen la vía del malato (Figura 7.2), están codificados en todos los genomas de fitoplasma secuenciados hasta este momento [31]. Este hecho refuerza la hipótesis que la EM puede tener un papel importante en estos organismos y por lo tanto ha resistido la eliminación por evolución reductiva.

Se vio que entre las diferentes EMs hay una gran variedad en su estructura y función biológica. Por ejemplo, sus tamaños oscilan entre los 42 kDa y los 83 kDa por monómero [139] y diferentes estructuras cuaternarias que van desde homodímeros a homooctámeros (M. A. Tronconi, Wheeler, y Maurino 2010; Chang y Tong 2003; Detarsio et al. 2008) e incluso heterodímeros [142].

En este contexto, se ve que la EM-AYWB, que tiene una estructura homodimérica formada por dos subunidades de aproximadamente 44 kDa está entre las EM más pequeñas y simples de todas las descritas hasta ahora. Además, la singular estructura tridimensional de la EM-AYWB tiene una característica sorprendente: el residuo de Tirosina-36, que es clave para la formación del sitio activo de un monómero, es aportado por un "brazo" que se extiende desde el otro monómero. Este residuo es fundamental para la actividad catalítica, pero no para la formación de la estructura del sitio activo, ni para el mantenimiento de la estructura cuaternaria de la proteína.

En general, la EM-AYWB puede adoptar diferentes cinéticas dependiendo del medio ambiente en que se encuentra la bacteria. Dado que los fitoplasmas habitan diversos ambientes, incluyendo el espacio intracelular del floema de las plantas hospedadoras y el lumen intestinal, ambientes intracelulares, hemolinfa y saliva de los insectos hospedadores, se requiere tal flexibilidad. Por ejemplo, el glutamato y la glutamina, dos aminoácidos abundantes en el floema de muchas especies de plantas [130], [143], pueden activar la EM-AYWB cuando los fitoplasmas crecen dentro de la planta hospedadora. Teniendo en cuenta todo esto, la compleja cinética de la EM-AYWB en respuesta a varios sustratos, cofactores y productos refleja la importancia de una fina regulación de la utilización del malato en fitoplasma. Esto involucra una rápida detección alostérica de la concentración de metabolitos clave a cargo de esta primera enzima de la ruta metabólica del malato, probablemente indicando en qué ambiente particular se encuentra la bacteria.

7.2.2. Caracterización cinética y regulación metabólica de la PduL de AYWB.

Como se mencionó anteriormente, se ha reportado que la enzima PduL codificada por el marco abierto de lectura AYWB_646 en fitoplasma AYWB (Figura 7.13), tiene actividad PTA en la vía de degradación del 1,2-propanodiol dependiente de B12 en *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* LT2 [132]. Análisis cinéticos de esta enzima mostraron que la PduL puede catalizar la conversión de propionil-fosfato a propionil-CoA y en menor medida, convertir acetil-fosfato a acetil-CoA [132].

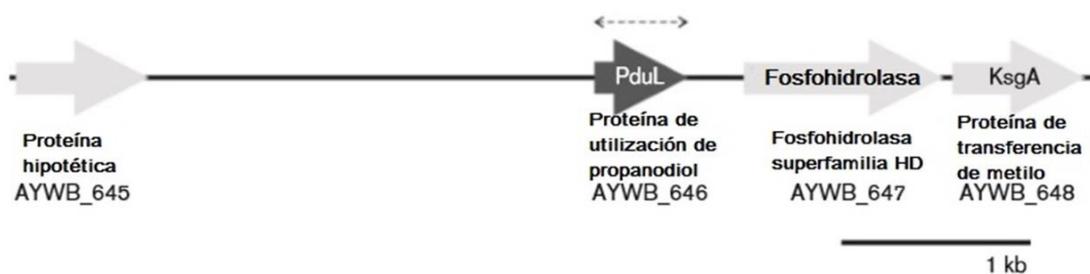


Figura 7.13. Organización genética del loci cromosómico de 'Ca. P. asteris' AYWB que contiene el gen que codifica para PduL y las regiones flanqueantes. La línea discontinua indica la región codificante clonada en el vector de expresión.

7.2.2.1. Caracterización cinética y regulación metabólica de la PduL de AYWB.

Para determinar si la enzima PduL participa en la vía de utilización del malato, en nuestro grupo de trabajo, evaluamos su capacidad de convertir el acetil-CoA a acetil-P (Figura 7.2).

Para esto, la enzima PduL de AYWB se clonó y se expresó heterológamente en *E. coli* de modo de producir la proteína recombinante. Luego, se purificó y se determinó que tiene una masa molecular monomérica de 22 kDa (Figura 7.14), lo cual se corresponde con la masa molecular predicha en base a su secuencia. La masa molecular nativa de la PduL se determinó por cromatografía de exclusión molecular. El valor obtenido ($42,6 \pm 0,5$ kDa) indica que la PduL de AYWB se ensambla en forma de dímero.

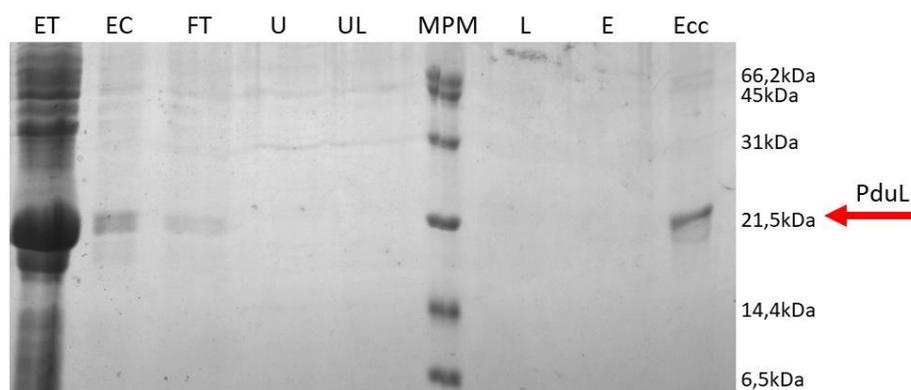


Figura 7.14. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes para la purificación de la PduL de fitoplasma AYWB. Se pueden ver las fracciones correspondientes al extracto total (ET), extracto crudo (EC), Flow Through (FT), lavado con solución de unión (U), lavado con una mezcla de las soluciones de unión y lavado (UL), marcador de peso molecular (MPM), lavado con solución de lavado (L), fracción eluída (E) y la fracción eluída concentrada (Ecc).

Posteriores ensayos cinéticos realizados con esta enzima purificada indicaron que la PduL de AYWB es capaz de catalizar la conversión de acetil-P a acetil-CoA con una $k_{cat} = 10,8 \pm 2$ s^{-1} , la cual está en el mismo rango que la k_{cat} de la PduL de *S. enterica* ($5,4$ s^{-1}). Además, la PduL de AYWB cataliza la conversión de acetil-CoA a acetil-fosfato con una k_{cat} de $6,26 \pm 0,64$ s^{-1} , aunque no se puede comparar con la k_{cat} de la PduL de *S. enterica*, ya que esta actividad no se midió para la PduL de este organismo.

Luego, medimos la actividad de la PduL de AYWB utilizando niveles subsaturantes de varios sustratos (4 mM de CoA y 2 mM de acetil-fosfato para la reacción directa y 0,02 mM de acetil-CoA para la reacción reversa) en presencia de diferentes metabolitos. Entre los compuestos ensayados (glutamato, glutamina, ATP, ADP, piruvato y acetato) solo el ATP y la glutamina mostraron modulación de la actividad de la PduL. El agregado de 4 mM de ATP disminuyó la velocidad de la conversión de acetil-CoA a acetil-fosfato de $6,1 \pm 0,4$ a $4,7 \pm 0,1$ U/mg, mientras que no modificó la reacción opuesta. Contrariamente, la glutamina a una concentración de 2 mM disminuyó la velocidad de conversión de acetil-fosfato a acetil-CoA de $11,9 \pm 0,6$ a $9,0 \pm 0,1$ U/mg, aunque este aminoácido tampoco modifica la reacción

opuesta. En presencia de piruvato a una concentración de 2 mM, ambas reacciones se activaron en igual proporción, sin una estimulación neta en ninguna dirección en particular. Por lo tanto, la enzima PduL de AYWB exhibe una actividad PTA regulada por metabolito en ambos sentidos de reacción (directo e inverso).

7.2.2.2. *Discusión.*

Por lo descrito en esta sección podemos ver que la enzima PduL tiene actividad PTA, lo que permite que pueda participar en la vía de utilización de malato. De esta manera, se refuerza la hipótesis de que esta vía sería operativa y que podría ser la única funcional que le permite a fitoplasma AYWB poder utilizar el malato como fuente de carbono y producir energía como consecuencia de su catabolismo.

Además, al igual que la EM, la PduL está regulada por el estado energético de la célula. Cuando hay energía suficiente en forma de ATP, se inhibe la actividad de esta enzima, evitando que transforme el acetyl-CoA en acetyl-fosfato y que se acumule acetato, el cual puede ser tóxico para la célula.

Además, ya que no se encontraron otros genes de la vía del propanodiol en fitoplasmas, tales como *pduCDE*, *pduQ*, *pduP* y *pduW*, es probable que PduL funcione en la vía de utilización del malato antes que en la vía de degradación de propanodiol [130].

7.3. Conclusiones

Dos proteínas clave de ‘*Candidatus Phytoplasma*’ Aster Yellow Witches’-Broom (AYWB), EM y PduL, se caracterizaron funcionalmente en este trabajo. Ambas funcionarían en la vía metabólica del malato que produce energía en forma de ATP y NAD(P)H como poder reductor (Figura 7.2).

Respecto de la EM codificada por el marco abierto de lectura AYWB_051, los resultados demostraron que tiene actividad para la descarboxilación oxidativa del malato, siendo capaz de convertir el malato a piruvato y CO₂, con la reducción concomitante de NAD a NADH o NADP a NADPH (Figuras 7.3 a 7.6). Además, se vio que su actividad está modulada por el estado energético de la célula representado por la relación ATP/ADP (Figuras 7.7 y 7.8). En relación con la estructura cuaternaria de esta enzima, se demostró que el residuo de Tyr36 no es crítico para su dimerización, pero sí es esencial para la catálisis (Figuras 7.10 a 7.12).

En cuanto a la PduL, codificada por el marco abierto de lectura AYWB_646, los resultados demostraron que efectivamente tiene actividad fosfotransacetilasa (PTA), siendo capaz de convertir el acetil-CoA a acetil-P y participando en la vía de utilización del malato (Figura 7.2). Además, la regulación de la actividad PTA de la PduL por ATP y glutamina, tal como ocurre con la EM, concuerda con un rol concertado de ambas enzimas en la conversión de malato a acetato.

Con todo esto, se puede proponer el siguiente modelo de regulación de la vía de utilización del malato (Figura 7.15).

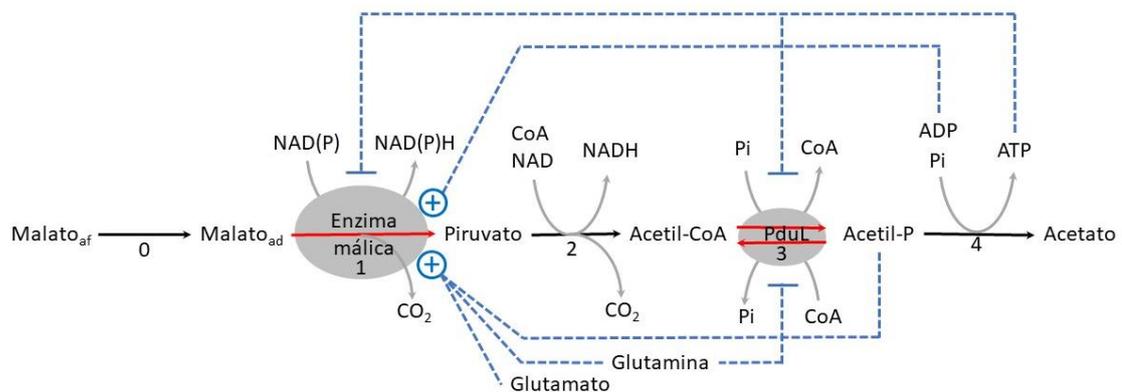


Figura 7.15. Modelo de regulación de la vía de utilización del malato en *Candidatus Phytoplasma* *Aster Yellow's Witches'-Broom* (AYWB). El estado energético de la célula, representado por la relación ATP/ADP, regula la actividad de la EM y de la PduL de forma concertada. Además el glutamato, glutamina y acetil-P, también regulan a estas dos importantes enzimas de la vía. Las líneas azules discontinuas indican efectos regulatorios.

Todo esto indica que la EM y la PduL son enzimas clave para la única vía de generación de energía en AYWB reportada hasta el momento, por lo que la funcionalidad de estas y su regulación por metabolitos y en consecuencia, de la vía de utilización del malato, constituyen un factor de virulencia fundamental para la persistencia, crecimiento y diseminación de fitoplasma.

Conclusiones generales

8. Conclusiones generales.

Acinetobacter baumannii y *Candidatus phytoplasma asteris* son dos patógenos con diferentes estilos de vida. Por un lado, *A. baumannii* es un patógeno nosocomial oportunista. Como tal, en los ambientes hospitalarios está sujeto a muchas situaciones de estrés, tales como hambreado severo, fluctuaciones de temperatura y de luz (debido al fotoperíodo) y exposición a sustancias tóxicas como antibióticos o agentes desinfectantes entre otras. Para poder subsistir y diseminarse debe sobreponerse y desarrollar métodos para superar estas adversidades. La luz y la temperatura son señales que le sirven para detectar el ambiente en el que se encuentra y en función de esto ejecutar diversas estrategias ya sea para la infección, para el escape o para la permanencia de un modo quiescente.

Por otro lado, los fitoplasmas son patógenos de plantas, endosimbiontes obligados que se propagan gracias al insecto vector, por lo que tienen que ser capaces de sobrevivir a ambientes tan diversos como los diferentes tejidos del insecto y el floema de la planta hospedadora. En este compartimiento abundan los azúcares y especialmente el malato.

La información disponible sugiere que debido a la gran disponibilidad de malato y otros azúcares en el floema de las plantas, fitoplasma ha desarrollado una estrategia en la que ha prescindido de los genes que codifican por componentes de la gran mayoría de las vías catabólicas ahorrando de esta manera la energía para mantener un genoma de gran tamaño.

A partir del trabajo realizado y los resultados obtenidos en la presente tesis se pueden llegar a las siguientes conclusiones:

Existe una temperatura crítica de transición a partir de la cual se pierde la regulación por luz de la motilidad. Esta modulación de la motilidad es reversible y dependiente de la luz y la temperatura. Además, está regulado a nivel de la expresión del fotorreceptor BlsA, como a nivel fotoquímico, el cual constituye una respuesta más rápida.

Los niveles diferenciales de transcritos y de proteína le permiten a la célula responder y adaptarse a las condiciones de luz o de oscuridad.

La fotoactividad de BlsA está gobernada por cambios conformacionales de la proteína dependientes de la temperatura. Estos reducen la eficiencia de la fotoactivación y producen una agregación proteica a temperaturas elevadas.

La modulación de la fotoactividad funciona como una primera línea de control y como un rápido sistema para la detección de cambios repentinos de condiciones.

Así, BlsA es un fotorreceptor que controla la respuesta a la luz a temperaturas bajas a moderadas y su regulación se da a dos niveles: expresión y fotoactividad.

Las cepas clínicas *A. nosocomialis* RUH2624 y *A. sp.* A47 son capaces de modular la motilidad en función de la luz en un amplio rango de temperaturas moderadamente altas incluyendo temperaturas compatibles con hospedadores humanos. Esto, probablemente sea consecuencia de una dotación numerosa de fotorreceptores, a diferencia de *A. baumannii* que sólo posee a BlsA, así como de la variabilidad de secuencia y estructura de estos, lo que podría hacer que posean un rango funcional diferencial que les permite regular a temperaturas a las cuales las bacterias que sólo poseen BlsA no son capaces de hacerlo.

Las evidencias presentadas muestran que el c-di-GMP y el producto del gen *bof* podrían ser intermediarios en la cadena de transducción de la señal lumínica.

BlsA y BOF podrían interactuar en condiciones de luz.

BlsA y BOF pueden interactuar con diversas proteínas involucradas en el metabolismo y la regulación de la expresión génica.

La participación del producto del gen *bof* en la formación de biofilms parece depender de BlsA, sin embargo la regulación de la motilidad sería dependiente de alguna molécula fotosensible distinta a BlsA e implicaría la participación del producto del gen *bof* cuando se encuentra a niveles elevados.

Posiblemente depende además de alguna otra molécula fotosensible distinta de BlsA.

La susceptibilidad a los antibióticos MIN y TIG está modulada por luz en *A. baumannii*.

Existe una correlación entre la reducción en la susceptibilidad a TIG inducida por luz y la inducción de la expresión de genes de bombas de eflujo, por lo que las bombas de eflujo AdeABC y AdeIJK podrían contribuir a la expulsión de TIG del interior celular y por consiguiente de la reducción en la susceptibilidad.

La modulación por luz de la susceptibilidad a MIN y TIG no depende de BlsA, pero estaría involucrando la participación del $^1\text{O}_2$.

Las diferencias observadas en la susceptibilidad a MIN y TIG en función de la luz señalan la profunda influencia que este estímulo puede tener en la susceptibilidad a los antibióticos, así como también el hecho de que se subestima la importancia de la luz como un estímulo ambiental clave.

Dos proteínas claves de '*Candidatus Phytoplasma' Aster Yellow's Witches'-Broom* (AYWB), EM y PduL estarían funcionando en la vía del malato que produce energía en forma de ATP y NAD(P)H como poder reductor.

La actividad de la EM y la PduL están reguladas concertadamente por el estado energético de la célula representado por la relación ATP/ADP.

El residuo de Tyr36 no es crítico para la dimerización de la EM, pero si es esencial para la actividad catalítica.

Para poder controlar a estos dos patógenos y las enfermedades producidas por ellos, es necesario conocerlos, saber cómo perciben su entorno y como responden a él. De este modo se pueden diseñar estrategias para combatirlos, controlarlos y quizás erradicarlos.

El objetivo último es mejorar la calidad de vida del ser humano ya sea evitando las enfermedades infecciosas por patógenos como *A. baumannii* o la pérdida de cultivos de alto interés alimentario por las infecciones causadas por patógenos como fitoplasma.

Bibliografía

9. Bibliografía

- [1] L. anne Pirofski y A. Casadevall, “Q and A What is a pathogen? A question that begs the point”, *BMC Biol.*, vol. 10, pp. 2–4, 2012.
- [2] A. Nemeč, L. Krizova, M. Maixnerova, T. J. K. Van Der Reijden, P. Deschaght, V. Passet, M. Vaneechoutte, S. Brisse, y L. Dijkshoorn, “Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus* e *Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp . nov . (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp . nov . (fo”, *Res. Microbiol.*, vol. 162, n° 4, pp. 393–404, 2011.
- [3] M. A. Mussi, A. S. Limansky, V. Relling, P. Ravasi, A. Arakaki, L. A. Actis, y A. M. Viale, “Horizontal gene transfer and assortative recombination within the *Acinetobacter baumannii* clinical population provide genetic diversity at the single *carO* gene, encoding a major outer membrane protein channel”, *J. Bacteriol.*, vol. 193, n° 18, pp. 4736–4748, 2011.
- [4] E. Bergogne-Bé, R. É. Zin, y K. J. Towner, “*Acinetobacter* ssp. as nosocomial Pathogens ”: *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 9, n° 2, pp. 148–165, 1996.
- [5] J. M. Thomson y R. A. Bonomo, “The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: β -lactams in peril!”, *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 8, n° 5, pp. 518–524, 2005.
- [6] A. H. Dorafshar, A. Charnot-Katsikas, J. K. Aycock, S. G. Weber, K. M. Frank, y M. Z. David, “Two Cases of Necrotizing Fasciitis Due to *Acinetobacter baumannii*”, *J. Clin. Microbiol.*, vol. 47, n° 1, pp. 258–263, 2008.
- [7] M.-L. Joly-Guillou, “Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*”, *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 11, n° 11, pp. 868–873, 2005.
- [8] B. Spellberg, “The future of antibiotics”, *Crit. Care*, vol. 18, n° 3, pp. 1–7, 2014.
- [9] S. Borgmann, C. Wolz, S. Gröbner, I. B. Autenrieth, P. Heeg, C. Goerke, K. Müller, P. Kyme, y M. Marschal, “Metallo- β -lactamase expressing multi-resistant *Acinetobacter baumannii* transmitted in the operation area”, *J. Hosp. Infect.*, vol. 57, n° 4, pp. 308–315, 2004.
- [10] D. M. Livermore, T. Nichols, T. L. Lamagni, N. Potz, R. Reynolds, y G. Duckworth, “Ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* from bacteraemias in England; increasingly

- prevalent and mostly from men”, *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 52, n° 6, pp. 1040–1042, 2003.
- [11] WHO, “GLOBAL PRIORITY LIST OF ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA TO GUIDE RESEARCH, DISCOVERY, AND DEVELOPMENT OF NEW ANTIBIOTICS”, 2017.
- [12] M. A. Mussi, J. A. Gaddy, M. Cabruja, B. A. Arivett, A. M. Viale, R. Rasia, y L. A. Actis, “The opportunistic human pathogen *Acinetobacter baumannii* senses and responds to light”, *J. Bacteriol.*, vol. 192, n° 24, pp. 6336–6345, 2010.
- [13] J. A. Gaddy y L. A. Actis, “Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation Jennifer”, *Futur. Microbiol.*, vol. 4, pp. 273–278, 2009.
- [14] A. P. Tomaras, C. W. Dorsey, R. E. Edelmann, y L. a. Actis, “Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: Involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system”, *Microbiology*, vol. 149, n° 12, pp. 3473–3484, 2003.
- [15] A. G. Jennifer, P. T. Andrew, y A. A. Luis, “The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells”, *Infect. Immun.*, vol. 77, n° 8, pp. 3150–3160, 2009.
- [16] A. Idnurm y S. Crosson, “The Photobiology of Microbial Pathogenesis”, *PLoS Pathog.*, vol. 5, n° 11, p. e1000470, 2009.
- [17] M. A. van der Horst, J. Key, y K. J. Hellingwerf, “Photosensing in chemotrophic, non-phototrophic bacteria: let there be light sensing too”, *Trends Microbiol.*, vol. 15, n° 12, pp. 554–562, 2007.
- [18] M. K. Purcell, A. L. Murray, A. Elz, L. K. Park, S. V. Marcquenski, J. R. Winton, S. W. Alcorn, R. J. Pascho, y D. G. Elliott, “Decreased mortality of lake michigan chinook salmon after bacterial kidney disease challenge: Evidence for pathogen-driven selection?”, *J. Aquat. Anim. Health*, vol. 20, n° 4, pp. 225–235, 2008.
- [19] L. Martínez, M. Porcar, P. Dorado-Morales, J. L. Racero, C. Vilanova, G. Zafrilla, M. Marín, L. Torralba, A. Iglesias, M. Collantes, J. J. Alcaina, L. J. Morales, y L. Gómez, “Towards light-mediated sensing of bacterial comfort”, *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 59, n° 2, pp. 127–132, 2014.
- [20] M. Gomelsky y S. Kaplan, “appA, A novel gene encoding a trans-acting factor involved in the regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*

- 2.4.1", *J. Bacteriol.*, vol. 177, n° 16, pp. 4609–4618, 1995.
- [21] A. Jung, T. Domratcheva, M. Tarutina, Q. Wu, W. -h. Ko, I. Schlichting, K. H. Gardner, M. Gomelsky, y R. L. Shoeman, "Structure of a bacterial BLUF photoreceptor: Insights into blue light-mediated signal transduction", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 102, n° 35, pp. 12350–12355, 2005.
- [22] M. Gomelsky y G. Klug, "BLUF: A novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms", *Trends Biochem. Sci.*, vol. 27, n° 10, pp. 497–500, 2002.
- [23] A. Golic, M. Vaneechoutte, A. Nemec, A. M. Viale, L. A. Actis, y M. A. Mussi, "Staring at the cold sun: blue light regulation is distributed within the genus *Acinetobacter*.", *PLoS One*, vol. 8, n° 1, p. e55059, 2013.
- [24] S. a. Hogenhout, K. Oshima, E. D. Ammar, S. Kakizawa, H. N. Kingdom, y S. Namba, "Phytoplasmas: Bacteria that manipulate plants and insects", *Mol. Plant Pathol.*, vol. 9, n° 4, pp. 403–423, 2008.
- [25] K. Oshima, K. Maejima, y S. Namba, "Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas", vol. 4, n° August, pp. 1–8, 2013.
- [26] I. Lee, R. E. Davis, y E. Dawn, "P HYTOPLASMA : Phytopathogenic Mollicutes *", *Annu. Rev. Microbiol.*, 2000.
- [27] A. Bertaccini y B. Duduk, "Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research", *Phytopathol. Mediterr.*, vol. 48, n° 3, pp. 355–378, 2009.
- [28] S. a. Hogenhout y R. Loria, "Virulence mechanisms of Gram-positive plant pathogenic bacteria", *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 11, n° 4, pp. 449–456, 2008.
- [29] S. Razin, D. Yogev, y Y. Naot, "Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas.", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 62, n° 4, pp. 1094–1156, 1998.
- [30] R. E. Davis, N. A. Harrison, Y. Zhao, W. Wei, y E. L. Dally, "'Candidatus *Phytoplasma hispanicum*', a novel taxon associated with Mexican periwinkle virescence disease of *Catharanthus roseus*", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 66, n° 9, pp. 3463–3467, 2016.
- [31] X. Bai, J. Zhang, A. Ewing, S. A. Miller, A. J. Radek, D. V Shevchenko, T. Walunas, A. Lapidus, W. John, S. A. Hogenhout, X. Bai, J. Zhang, A. Ewing, S. A. Miller, A. J. Radek, D. V Shevchenko, K. Tsukerman, T. Walunas, A. Lapidus, J. W. Campbell, y S. A. Hogenhout, "Living with Genome Instability : the Adaptation of Phytoplasmas to Diverse Environments of Their Insect and Plant Hosts Living with Genome Instability :

- the Adaptation of Phytoplasmas to Diverse Environments of Their Insect and Plant Hosts ††”, vol. 188, n° 10, pp. 3682–3696, 2006.
- [32] R. Jomantiene y R. E. Davis, “Clusters of diverse genes existing as multiple, sequence-variable mosaics in a phytoplasma genome”, *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 255, n° 1, pp. 59–65, 2006.
- [33] R. Jomantiene, Y. Zhao, y R. E. Davis, “Sequence-Variable Mosaics: Composites of Recurrent Transposition Characterizing the Genomes of Phylogenetically Diverse Phytoplasmas”, *DNA Cell Biol.*, vol. 26, n° 8, pp. 557–564, 2007.
- [34] H. Ochman y L. M. Davalos, “The Nature and Dynamics of Bacterial Genomes”, *Science (80-.)*, vol. 311, 2006.
- [35] K. Oshima, S. Kakizawa, H. Nishigawa, H.-Y. Jung, W. Wei, S. Suzuki, R. Arashida, D. Nakata, S. Miyata, M. Ugaki, y S. Namba, “Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma.”, *Nat. Genet.*, vol. 36, n° 1, pp. 27–29, 2004.
- [36] A. Bertaccini, “Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology.”, *Front. Biosci.*, vol. 12, pp. 673–689, 2007.
- [37] A. Sugio, A. M. MacLean, H. N. Kingdom, V. M. Grieve, R. Manimekalai, y S. A. Hogenhout, “Diverse Targets of Phytoplasma Effectors: From Plant Development to Defense Against Insects”, *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 49, n° 1, pp. 175–195, 2011.
- [38] N. M. Christensen, K. B. Axelsen, M. Nicolaisen, y A. Schulz, “Phytoplasmas and their interactions with hosts”, *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 10, n° 11, 2005.
- [39] R. Tedeschi, D. Bosco, y A. Alma, “Population Dynamics of *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae), a Vector of Apple Proliferation Phytoplasma in Northwestern Italy”, *J. Econ. Entomol.*, vol. 95, n° 3, pp. 544–551, 2002.
- [40] L. Beanland, C. W. Hoy, S. A. Miller, y L. R. Nault, “Influence of Aster Yellows Phytoplasma on the Fitness of Aster Leafhopper (Homoptera: Cicadellidae)”, *Ann. Entomol. Soc. Am.*, vol. 93, n° 2, pp. 271–276, 2000.
- [41] Z. Orlovskis y S. A. Hogenhout, “A bacterial parasite effector mediates insect vector attraction in host plants independently of developmental changes”, *bioRxiv*, vol. 7, n° June, p. 036186, 2016.
- [42] N. M. Christensen, M. Nicolaisen, M. Hansen, y A. Schulz, “Distribution of Phytoplasmas in Infected Plants as Revealed by Real-Time PCR and Bioimaging”, *Mol.*

- Plant-Microbe Interact.*, vol. 17, n° 11, pp. 1175–1184, 2004.
- [43] P. G. Weintraub y L. Beanland, “Insect Vectors of Phytoplasmas”, *Annu. Rev. Entomol.*, vol. 51, n° 1, pp. 91–111, 2006.
- [44] I. M. Lee, D. E. Gundersen-Rindal, R. E. Davis, K. D. Bottner, C. Marccone, y E. Seemüller, “‘Candidatus Phytoplasma asteris’, a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases”, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 54, n° 4, pp. 1037–1048, 2004.
- [45] K. Oshima, Y. Ishii, S. Kakizawa, K. Sugawara, Y. Neriya, M. Himeno, N. Minato, C. Miura, T. Shiraishi, Y. Yamaji, y S. Namba, “Dramatic Transcriptional Changes in an Intracellular Parasite Enable Host Switching between Plant and Insect”, vol. 6, n° 8, 2011.
- [46] D. K. R. Karaolis, M. H. Rashid, R. Chythanya, W. Luo, M. Hyodo, y Y. Hayakawa, “c-di-GMP (3′-5′-Cyclic Diguanylic Acid) Inhibits *Staphylococcus aureus* Cell-Cell Interactions and Biofilm Formation”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 49, n° 3, pp. 1029–1038, mar. 2005.
- [47] Š. Čikoš, A. Bukovská, y J. Koppel, “Relative quantification of mRNA: Comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis”, *BMC Mol. Biol.*, vol. 8, pp. 1–14, 2007.
- [48] J. Hellemans, G. Mortier, A. De Paepe, F. Speleman, y J. Vandesompele, “qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data.”, *Genome Biol.*, vol. 8, n° 2, p. R19, 2007.
- [49] M. M. Bradford, “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, *Anal. Biochem.*, vol. 72, pp. 248–254, 1976.
- [50] M. Galbis-Martínez, S. Padmanabhan, F. J. Murillo, y M. Elías-Arnanz, “Carf mediates signaling by singlet oxygen, generated via photoexcited protoporphyrin IX, in *myxococcus xanthus* light-induced carotenogenesis”, *J. Bacteriol.*, vol. 194, n° 6, pp. 1427–1436, 2012.
- [51] E. Vilacoba, M. Almuzara, L. Gulone, R. Rodríguez, E. Pallone, R. Bakai, D. Centrón, y M. S. Ramírez, “Outbreak of Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Indigo-Pigmented Strains”, *J. Clin. Microbiol.*, vol. 51, n° 11, pp. 3726–3730, 2013.
- [52] M. Almuzara, G. M. Traglia, L. Krizova, C. Barberis, S. Montaña, R. Bakai, A. Tuduri, C.

- Vay, A. Nemec, y M. S. Ramírez, "A Taxonomically Unique Acinetobacter Strain with Proteolytic and Hemolytic Activities Recovered from a Patient with a Soft Tissue", *J. Clin. Microbiol.*, vol. 53, n° 1, pp. 349–351, 2015.
- [53] G. M. Traglia, M. Almuzara, C. Barberis, S. Montaña, S. T. J. Schramm, B. Enriquez, M. A. Mussi, C. Vay, A. Iriarte, y M. S. Ramírez, "Draft Genome Sequence of a Taxonomically Unique Acinetobacter Clinical Strain with Proteolytic and Hemolytic Activities", *Genome Announc.*, vol. 3, n° 2, pp. e00030-15, 2015.
- [54] M. S. Ramirez, M. Don, A. K. Merquier, A. J. S. Bistué, A. Zorreguieta, D. Centrón, y M. Tolmasky, "Naturally Competent Acinetobacter baumannii Clinical Isolate as a Convenient Model for Genetic Studies", *J. Clin. Microbiol.*, vol. 48, n° 4, pp. 1488–1490, 2010.
- [55] M. Hunger, R. Schmucker, V. Kishan, y W. Hillen, "Analysis and nucleotide sequence of an origin of an origin of DNA replication in Acinetobacter calcoaceticus and its use for Escherichia coli shuttle plasmids", *Gene*, vol. 87, n° 1, pp. 45–51, 1990.
- [56] R. C. Edgar, "MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput", *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, n° 5, pp. 1792–1797, 2004.
- [57] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, y S. Kumar, "MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0", *Mol. Biol. Evol.*, vol. 30, n° 12, pp. 2725–2729, 2013.
- [58] I. Abatedaga, L. Valle, A. E. Golic, G. L. Müller, M. Cabruja, F. E. Morán Vieyra, P. C. Jaime, M. A. Mussi, y C. D. Borsarelli, "Integration of Temperature and Blue-Light Sensing in *Acinetobacter baumannii* Through the BlsA Sensor", *Photochem. Photobiol.*, vol. 93, n° 3, pp. 805–814, 2017.
- [59] C. E. Alvarez, F. Trajtenberg, N. Larrieux, M. Saigo, A. Golic, C. S. Andreo, S. A. Hogenhout, M. A. Mussi, M. F. Drincovich, y A. Buschiazzo, "The crystal structure of the malic enzyme from candidatus phytoplasma reveals the minimal structural determinants for a malic enzyme", *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.*, vol. 74, n° 4, pp. 332–340, 2018.
- [60] E. Krissinel y K. Henrick, "Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State", *J. Mol. Biol.*, vol. 372, n° 3, pp. 774–797, 2007.
- [61] M. A. Tronconi, M. C. G. Wheeler, y G. Maurino, "mechanisms that support differences in physiological control", vol. 303, pp. 295–303, 2010.

- [62] E. Detarsio, C. E. Alvarez, M. Saigo, C. S. Andreo, y M. F. Drincovich, "Identification of Domains Involved in Tetramerization and Malate Inhibition of Maize C 4 -NADP-Malic Enzyme", *J. Biol. Chem.*, vol. 282, n° 9, pp. 6053–6060, 2006.
- [63] F. P. Bologna, V. A. Campos-bermudez, D. D. Saavedra, C. S. Andreo, y M. F. Drincovich, "Characterization of *Escherichia coli* EutD : a Phosphotransacetylase of the Ethanolamine Operon", vol. 48, n° 3, 2010.
- [64] L. Valle, I. Abatedaga, F. E. M. Vieyra, A. Bortolotti, N. Cortez, y C. D. Borsarelli, "Enhancement of photophysical and photosensitizing properties of flavin adenine dinucleotide by mutagenesis of the C-terminal extension of a bacterial flavodoxin reductase", *ChemPhysChem*, vol. 16, n° 4, pp. 872–883, 2015.
- [65] C. R. Wood, E. J. Ohneck, R. E. Edelman, y L. A. Actis, "A light-regulated type I pilus contributes to *Acinetobacter baumannii* biofilm, motility and virulence functions", *Infect. Immun.*, n° June, p. IAI.00442-18, 2018.
- [66] B. O'Donoghue, K. NicAogáin, C. Bennett, A. Conneely, T. Tiensuu, J. Johansson, y C. O'Byrne, "Blue-Light Inhibition of *Listeria monocytogenes* Growth Is Mediated by Reactive Oxygen Species and Is Influenced by σ B and the Blue-Light Sensor Lmo0799", *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 82, n° 13, pp. 4017–4027, 2016.
- [67] T. Tiensuu, C. Andersson, P. Rydén, y J. Johansson, "Cycles of light and dark coordinate reversible colony differentiation in *Listeria monocytogenes*", *Mol. Microbiol.*, vol. 87, n° 4, pp. 909–924, 2013.
- [68] H. J. Doughari, P. A. Ndakidemi, I. S. Human, y S. Benade, "Minireview The Ecology , Biology and Pathogenesis of *Acinetobacter* spp .: An Overview", vol. 26, n° 2, pp. 101–112, 2011.
- [69] A. Borer, J. Gilad, R. Smolyakov, S. Eskira, N. Peled, N. Porat, E. Hyam, R. Trefler, K. Riesenber, y F. Schlaeffer, "Cell Phones and *Acinetobacter* Transmission", *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 11, n° 7, pp. 1160–1161, 2005.
- [70] M. V. Villegas y A. I. Hartstein, "Acinebacter outbreaks, 1977–2000", *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 53, n° 9, pp. 1689–1699, 2013.
- [71] U. Römling, M. Y. Galperin, y M. Gomelsky, "Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger", *Am. Soc. Microbiol.*, vol. 77, n° 1, pp. 1–52, 2013.
- [72] E. Mills, I. S. Pultz, H. D. Kulasekara, y S. I. Miller, "The bacterial second messenger c-

- di-GMP: Mechanisms of signalling”, *Cell. Microbiol.*, vol. 13, n° 8, pp. 1122–1129, 2011.
- [73] U. Römling, M. Gomelsky, y M. Y. Galperin, “C-di-GMP: The dawning of a novel bacterial signalling system”, *Mol. Microbiol.*, vol. 57, n° 3, pp. 629–639, 2005.
- [74] J. Ribbe, A. E. Baker, S. Euler, G. A. O’Toole, y B. Maiera, “Role of Cyclic Di-GMP and Exopolysaccharide in Type IV Pilus Dynamics”, *J. Bacteriol.*, vol. 199, n° 8, 2017.
- [75] D. Pérez-Mendoza, I. M. Aragón, H. A. Prada-Ramírez, L. Romero-Jiménez, C. Ramos, M. T. Gallegos, y J. Sanjuán, “Responses to elevated c-di-GMP levels in mutualistic and pathogenic plant-interacting bacteria”, *PLoS One*, vol. 9, n° 3, 2014.
- [76] R. Tamayo, J. T. Pratt, y A. Camilli, “Roles of Cyclic Diguanylate in the Regulation of Bacterial Pathogenesis”, *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 61, n° 1, pp. 131–148, 2007.
- [77] C. L. Giltner, Y. Nguyen, y L. L. Burrows, “Type IV Pilin Proteins: Versatile Molecular Modules”, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 76, n° 4, pp. 740–772, 2012.
- [78] A. J. Wolfe y K. L. Visick, “Get the message out: Cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility”, *J. Bacteriol.*, vol. 190, n° 2, pp. 463–475, 2008.
- [79] D. A. Ryjenkov, R. Simm, U. Römling, y M. Gomelsky, “The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: The PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria”, *J. Biol. Chem.*, vol. 281, n° 41, pp. 30310–30314, 2006.
- [80] A. Boehm, M. Kaiser, H. Li, C. Spangler, C. A. Kasper, M. Ackermann, V. Kaefer, V. Sourjik, V. Roth, y U. Jenal, “Second Messenger-Mediated Adjustment of Bacterial Swimming Velocity”, *Cell*, vol. 141, n° 1, pp. 107–116, 2010.
- [81] M. K. Sarkar, K. Paul, y D. F. Blair, “Chemotaxis signaling protein CheY binds to the rotor protein FliN to control the direction of flagellar rotation in *Escherichia coli*.”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, n° 20, pp. 9370–9375, 2010.
- [82] D. G. Ha, M. E. Richman, y G. A. O’Toole, “Deletion mutant library for investigation of functional outputs of cyclic diguanylate metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PA14”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 80, n° 11, pp. 3384–3393, 2014.
- [83] Y. Chen, J. Xia, Z. Su, G. Xu, M. Gomelsky, G. Quian, y F. Liu, “*Lysobacter* PilR, the Regulator of Type IV Pilus Synthesis, Controls Antifungal Antibiotic Production via a Cyclic di-GMP Pathway”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 83, n° 7, pp. 1–19, 2017.
- [84] F. Sisti, D. G. Ha, G. A. O’Toole, D. Hozbor, y J. Fernández, “Cyclic-di-GMP signalling regulates motility and biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*”, *Microbiol.*

- (*United Kingdom*), vol. 159, n° PART 5, pp. 869–879, 2013.
- [85] R. Simm, M. Morr, A. Kader, M. Nimtz, y U. Römling, “GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessibility to motility”, *Mol. Microbiol.*, vol. 53, n° 4, pp. 1123–1134, 2004.
- [86] L. Tagliabue, D. Antoniani, A. Maciåg, P. Bocci, N. Raffaelli, y P. Landini, “The diguanylate cyclase YddV controls production of the exopolysaccharide poly-N-acetylglucosamine (PNAG) through regulation of the PNAG biosynthetic pgaABCD operon”, *Microbiology*, vol. 156, n° 10, pp. 2901–2911, 2010.
- [87] K. M. Thormann, S. Duttler, R. M. Saville, M. Hyodo, S. Shukla, Y. Hayakawa, y A. M. Spormann, “Control of Formation and Cellular Detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 Biofilms by Cyclic di-GMP”, *Microbiology*, vol. 188, n° 7, pp. 2681–2691, 2006.
- [88] A. Nakhamchik, C. Wilde, y D. A. Rowe-Magnus, “Cyclic-di-GMP Regulates Extracellular Polysaccharide Production, Biofilm Formation, and Rugose Colony Development by *Vibrio vulnificus*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, n° 13, pp. 4199–4209, 2008.
- [89] D. Pérez-Mendoza, S. J. Coulthurst, J. Sanjuán, y G. P. C. Salmond, “N-Acetylglucosamine-dependent biofilm formation in *Pectobacterium atrosepticum* is cryptic and activated by elevated c-di-GMP levels”, *Microbiology*, vol. 157, n° 12, pp. 3340–3348, 2011.
- [90] S. Schäper, E. Krol, D. Skotnicka, V. Kaeffer, R. Hilker, L. Søggaard-Andersen, y A. Becker, “Cyclic di-GMP regulates multiple cellular functions in the symbiotic alphaproteobacterium *Sinorhizobium meliloti*”, *J. Bacteriol.*, vol. 198, n° 3, pp. 521–535, 2015.
- [91] R. L. Flynn y L. Zou, “Oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold proteins: A growing family of genome guardians”, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 45, n° 4, pp. 266–275, 2010.
- [92] V. M. Waldman, E. Weiland, A. G. Kozlov, y T. M. Lohman, “Is a fully wrapped SSB-DNA complex essential for *Escherichia coli* survival?”, *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, n° 9, pp. 4317–4329, 2016.
- [93] Y. Huang y C. Huang, “SAAV2152 is a single-stranded DNA binding protein : the third SSB in *Staphylococcus aureus*”, *Oncotarget*, vol. 9, n° 29, pp. 20239–20254, 2018.

- [94] Y. H. Huang y C. Y. Huang, “Structural insight into the DNA-binding mode of the primosomal proteins PriA, PriB, and AnaT”, *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, n° Figure 2, 2014.
- [95] C. Voigt, M. Dobrychlop, E. Kruse, A. Czerwoniec, J. M. Kasprzak, P. Bytner, C. Del Campo, W. M. Leeder, J. M. Bujnicki, y H. U. Göringer, “The OB-fold proteins of the *Trypanosoma brucei* editosome execute RNA-chaperone activity”, *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, n° 19, pp. 10353–10367, 2018.
- [96] D. H. Kim, S. J. Kang, K. Y. Lee, S. B. Jang, S. M. Kang, y B. J. Lee, “Structure and dynamics study of translation initiation factor 1 from *Staphylococcus aureus* suggests its RNA binding mode”, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1865, n° 1, pp. 65–75, 2017.
- [97] D. Kapps, M. Cela, A. Théobald-Dietrich, T. Hendrickson, y M. Frugier, “OB or Not OB: Idiosyncratic utilization of the tRNA-binding OB-fold domain in unicellular, pathogenic eukaryotes”, *FEBS Lett.*, vol. 590, n° 23, pp. 4180–4191, 2016.
- [98] M. A. Swairjo, A. J. Morales, C. C. Wang, A. R. Ortiz, y P. Schimmel, “Crystal structure of trbp111: a structure-specific tRNA-binding protein.”, *EMBO J.*, vol. 19, n° 23, pp. 6287–98, 2000.
- [99] H. Suzuki, A. Kaneko, T. Yamamoto, M. Nambo, I. Hirasawa, T. Umehara, H. Yoshida, S. Y. Park, y K. Tamura, “Binding Properties of Split tRNA to the C-terminal Domain of Methionyl-tRNA Synthetase of *Nanoarchaeum equitans*”, *J. Mol. Evol.*, vol. 84, n° 5–6, pp. 267–278, 2017.
- [100] T. Nomanbhoy, A. J. Morales, A. T. Abraham, C. S. Vörtler, R. Giegé, y P. Schimmel, “Simultaneous binding of two proteins to opposite sides of a single transfer RNA”, *Nat. Struct. Biol.*, vol. 8, n° 4, pp. 344–348, 2001.
- [101] H. Y. Cho, S. J. Maeng, H. J. Cho, Y. S. Choi, J. M. Chung, S. Lee, H. K. Kim, J. H. Kim, C. Y. Eom, Y. G. Kim, M. Guo, H. S. Jung, B. S. Kang, y S. Kim, “Assembly of multi-tRNA synthetase complex via heterotetrameric glutathione transferase-homology domains”, *J. Biol. Chem.*, vol. 290, n° 49, pp. 29313–29328, 2015.
- [102] K. Ginalski, L. Kinch, L. Rychlewski, y N. V. Grishin, “BOF: A novel family of bacterial OB-fold proteins”, *FEBS Lett.*, vol. 567, n° 2–3, pp. 297–301, 2004.
- [103] G. L. Müller, M. Tuttobene, M. Altilio, M. Martinez Amezaga, M. Nguyen, Cribb Pamela, L. E. Cybulski, M. S. Ramírez, S. Altabe, y M. A. Mussi, “Light Modulates

- Metabolic Pathways and Other Novel Physiological Traits in the Human Pathogen *Acinetobacter baumannii*", *J. Bacteriol.*, vol. 199, n° 10, pp. 1–17, 2017.
- [104] M. R. Tuttobene, P. Cribb, y M. A. Mussi, "BlsA integrates light and temperature signals into iron metabolism through Fur in the human pathogen *Acinetobacter baumannii*", *Sci. Rep.*, vol. 8, n° 7728, pp. 1–12, 2018.
- [105] H. Kulesekara, V. Lee, A. Brencic, N. Liberati, J. Urbach, S. Miyata, D. G. Lee, A. N. Neely, M. Hyodo, Y. Hayakawa, F. M. Ausubel, y S. Lory, "Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 103, n° 8, pp. 2839–2844, 2005.
- [106] M. D. Juárez-Rodríguez, A. Torres-Escobar, y D. R. Demuth, "ygiW and qseBC are co-expressed in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and regulate biofilm growth", *Microbiol. (United Kingdom)*, vol. 159, n° PART 6, pp. 989–1001, 2013.
- [107] M. Merighi, A. N. Septer, A. Carroll-Portillo, A. Bhatiya, S. Porwollik, M. McClelland, y J. S. Gunn, "Genome-wide analysis of the PreA/PreB (QseB/QseC) regulon of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium", *BMC Microbiol.*, vol. 9, pp. 1–11, 2009.
- [108] J. M. Ortiz-Guerrero, M. C. Polanco, F. J. Murillo, S. Padmanabhan, y M. Elías-Arnanz, "Light-dependent gene regulation by a coenzyme B12-based photoreceptor.", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, n° 18, pp. 7565–7570, 2011.
- [109] E. S. Snitkin, A. M. Zelazny, C. I. Montero, F. Stock, L. Mijares, N. comparative sequence Program, P. R. Murray, y J. A. Segre, "Genome-wide recombination drives diversification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii*", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, n° 33, pp. 13758–13763, 2011.
- [110] S. Y.-Y. Tan, S. L. Chua, Y. Liu, N. M. Høiby, L. P. Andersen, M. Givskov, L. Yang, y Z. Song, "Comparative Genomic Analysis of Rapid Evolution of an Extreme-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clone", *Genome Biol. Evol.*, vol. 5, n° 5, pp. 807–818, 2013.
- [111] A. P. Magiorakos, A. Srinivasan, R. B. Carey, Y. Carmeli, M. E. Falagas, C. G. Giske, S. Harbarth, J. F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D. L. Paterson, L. B. Rice, J. Stelling, M. J. Struelens, A. Vatopoulos, J. T. Weber, y D. L. Monnet, "Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance", *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 18, n° 3, pp. 268–281, 2012.

- [112] A. Y. Peleg, H. Seifert, y D. L. Paterson, "Acinetobacter baumannii: Emergence of a successful pathogen", *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 21, n° 3, pp. 538–582, 2008.
- [113] J. Povilonis, V. Seputiene, R. Krasauskas, R. Juskaite, M. Miskinyte, K. Suziedelis, y E. Suziedeliene, "Spread of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii carrying a plasmid with two genes encoding OXA-72 carbapenemase in Lithuanian hospitals.", *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 68, n° 5, pp. 1000–6, 2013.
- [114] D. Protic, A. Pejovic, D. Andjelkovic, N. Djukanovic, D. Savic, P. Piperac, L. Markovic Denic, M. Zdravkovic, y Z. Todorovic, "Nosocomial Infections Caused by *Acinetobacter baumannii*: Are We Losing the Battle?", *Surg. Infect. (Larchmt).*, vol. 17, n° 2, p. sur.2015.128, 2016.
- [115] P. A. Bradford, D. T. Weaver-Sands, y P. J. Petersen, "In Vitro Activity of Tigecycline against Isolates from Patients Enrolled in Phase 3 Clinical Trials of Treatment for Complicated Skin and Skin-Structure Infections and Complicated Intra-Abdominal Infections", *Clin. Infect. Dis.*, vol. 41, n° s5, pp. S315–S332, 2005.
- [116] G. H. Talbot, J. Bradley, J. E. Edwards, D. Gilbert, M. Scheld, y J. G. Bartlett, "Bad Bugs Need Drugs: An Update on the Development Pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America", *Clin. Infect. Dis.*, vol. 42, n° 5, pp. 657–668, 2006.
- [117] M. S. Ramírez, G. M. Traglia, J. F. Pérez, G. L. Müller, M. F. Martínez, A. E. Golic, y M. A. Mussi, "White and blue light induce reduction in susceptibility to minocycline and tigecycline in *Acinetobacter* spp. and other bacteria of clinical importance.", *J. Med. Microbiol.*, vol. 64, n° Pt 5, pp. 525–37, may 2015.
- [118] A. Ribera, J. Ruiz, J. Vila, A. Ribera, J. Ruiz, y J. Vila, "Presence of the Tet M Determinant in a Clinical Isolate of *Acinetobacter baumannii* Presence of the Tet M Determinant in a Clinical Isolate of *Acinetobacter baumannii*", vol. 47, n° 7, pp. 2310–2312, 2003.
- [119] A. Ruzin, D. Keeney, y P. A. Bradford, "AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex", *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 59, n° 5, pp. 1001–1004, 2007.
- [120] P. G. Higgins, T. Schneiders, A. Hamprecht, y H. Seifert, "In vivo selection of a missense mutation in *adeR* and conversion of the novel *bla*OXA-164 gene into

- blaOXA-58in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospitalized patient”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 54, n° 12, pp. 5021–5027, 2010.
- [121] L. Damier-Piolle, S. Magnet, S. Brémont, T. Lambert, y P. Courvalin, “AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 52, n° 2, pp. 557–562, 2008.
- [122] N. Rosenfeld, C. Bouchier, P. Courvalin, y B. Périchon, “Expression of the resistance-nodulation-cell division pump AdeIJK in *Acinetobacter baumannii* is regulated by AdeN, a TetR-type regulator”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 56, n° 5, pp. 2504–2510, 2012.
- [123] E. C. Ziegelhoffer y T. J. Donohue, “Bacterial responses to photo-oxidative stress Eva”, *Biophys. Chem.*, vol. 7, n° 12, pp. 856–863, 2009.
- [124] J. Glaeser, A. M. Nuss, B. A. Berghoff, y G. Klug, *Singlet Oxygen Stress in Microorganisms*, 1ª ed., vol. 58. Elsevier Ltd., 2011.
- [125] I. E. Kochevar y R. R. W., “P h o t o s e n s i t i z e d Production of Singlet Oxygen”, *Methods Enzymol.*, vol. 319, pp. 20–28, 2000.
- [126] K. J. Mellish, R. D. Cox, D. I. Vernon, J. Griffiths, y S. B. Broun., “In Vitro Photodynamic Activity of a Series of Methylene Blue Analogues¶”, *Photochem. Photobiol.*, vol. 75, n° 4, p. 392, 2002.
- [127] B. A. Berghoff, J. Glaeser, C. M. Sharma, J. Vogel, y G. Klug, “Photooxidative stress-induced and abundant small RNAs in *Rhodobacter sphaeroides*”, *Mol. Microbiol.*, vol. 74, n° 6, pp. 1497–1512, 2009.
- [128] E. Strauss, “Phytoplasma Research Begins to Bloom”, *News Focus*, n° July, pp. 388–390, 2009.
- [129] M. P. Giménez Pecci, I. G. Laguna, A. O. Avila, A. M. M. de Remes Lenicov, E. G. Virla, C. Borgogno, C. F. Nome, y S. Paradell, “Difusión del Corn Stunt Spiroplasma del maíz (*Spiroplasma kunkelii*) y del vector (*Dalbulus maidis*) en la República Argentina”, *Rev. la Fac. Agron. La Plata*, vol. 105, n° 1, pp. 1–8, 2002.
- [130] M. Kube, J. Mitrovic, B. Duduk, R. Rabus, y E. Seemüller, “Current View on Phytoplasma Genomes and Encoded Metabolism”, *Sci. World J.*, vol. 2012, pp. 1–25, 2012.

- [131] W. Eisenreich, T. Dandekar, J. Heesemann, y W. Goebel, “Carbon metabolism of intracellular”, *Nat. Publ. Gr.*, vol. 8, n° 6, pp. 401–412, 2010.
- [132] Y. Liu, N. a. Leal, E. M. Sampson, C. L. V Johnson, G. D. Havemann, y T. a. Bobik, “PduL is an evolutionarily distinct phosphotransacylase involved in B 12-dependent 1,2-propanediol degradation by *Salmonella enterica* serovar typhimurium LT2”, *J. Bacteriol.*, vol. 189, n° 5, pp. 1589–1596, 2007.
- [133] M. Saigo, A. Golic, C. E. Alvarez, C. S. Andreo, S. a Hogenhout, M. a Mussi, y M. F. Drincovich, “Metabolic regulation of phytoplasma malic enzyme and phosphotransacetylase supports the use of malate as an energy source in these plant pathogens.”, *Microbiology*, vol. 160, n° Pt 12, pp. 2794–806, 2014.
- [134] G. Maurino, E. Detarsio, M. Saigo, y F. P. Bologna, “Maize recombinant non-C 4 NADP-malic enzyme : A novel dimeric malic enzyme with high specific activity”, pp. 97–107, 2004.
- [135] Y. Xu, G. Bhargava, H. Wu, G. Loeber, y L. Tong, “Crystal structure of human mitochondrial NAD (P) + -dependent malic enzyme : a new class of oxidative decarboxylases”, pp. 877–889.
- [136] Z. Yang, H. Zhang, H. Hung, C. Kuo, L. Tsai, H. S. Yuan, W. Chou, y G. Chang, “Structural studies of the pigeon cytosolic NADP + -dependent malic enzyme”, pp. 332–341, 2002.
- [137] D. E. Coleman, G. S. J. Rao, E. J. Goldsmith, P. F. Cook, y B. G. Harris, “Crystal Structure of the Malic Enzyme from *Ascaris suum* Complexed with Nicotinamide Adenine Dinucleotide at 2.3 Å Resolution”, *Biochemistry*, vol. 41, pp. 6928–6938, 2002.
- [138] P. Mortera, M. Espariz, C. Suárez, G. Repizo, J. Deutscher, S. Alarcón, V. Blancato, y C. Magni, “Fine-Tuned Transcriptional Regulation of Malate Operons in *Enterococcus faecalis*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 78, n° 6, pp. 1936–1945, 2012.
- [139] F. P. Bologna, C. S. Andreo, y M. F. Drincovich, “*Escherichia coli* malic enzymes: Two isoforms with substantial differences in kinetic properties, metabolic regulation, and structure”, *J. Bacteriol.*, vol. 189, n° 16, pp. 5937–5946, 2007.
- [140] E. Detarsio, V. G. Maurino, C. E. Alvarez, G. L. Müller, C. S. Andreo, y M. F. Drincovich, “Maize cytosolic NADP-malic enzyme (ZmCytNADP-ME): A phylogenetically distant isoform specifically expressed in embryo and emerging roots”, *Plant Mol. Biol.*, vol. 68, n° 4–5, pp. 355–367, 2008.

- [141] G. Chang y L. Tong, "Current Topics Structure and Function of Malic Enzymes , A New Class of Oxidative", *Society*, vol. 42, n° 44, 2003.
- [142] M. a Tronconi, H. Fahnenstich, M. C. Gerrard Weehler, C. S. Andreo, U.-I. Flügge, M. F. Drincovich, y V. G. Maurino, "Arabidopsis NAD-malic enzyme functions as a homodimer and heterodimer and has a major impact on nocturnal metabolism.", *Plant Physiol.*, vol. 146, n° 4, pp. 1540–1552, 2008.
- [143] J. Weibull, F. Ronquist, y S. Brishammar, "Free amino acid composition of leaf exudates and Phloem sap", *Plant Physiol.*, vol. 92, n° 1, pp. 222–6, 1990.
- [144] H Curtis, S Barnes, A Schnek y A Massarini, "Biología", Ed. Médica Panamericana, 2008.