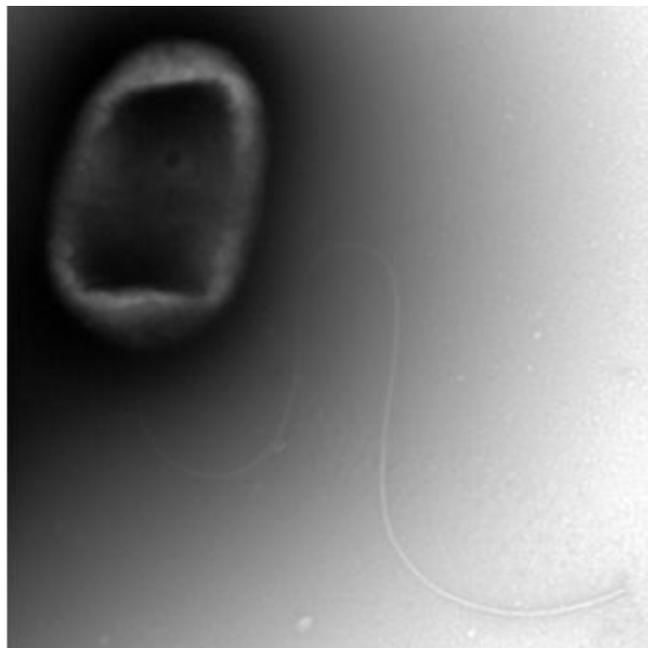




Tesis de maestría en Ciencias Biológicas-
orientación biología celular y molecular.

**"Caracterización proteómica y
funcional de una cepa de
Pseudomonas aeruginosa que
sobreexpresa una fosfodiesterasa
específica de di-GMPc".**



Lic. Jessica Rossello
Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas
Tutora: Dra. Rosario Durán
Co-tutora: Dra. Arlinet Kierbel

Tesis de maestría en Ciencias biológicas, opción Biología Celular y Molecular.

Octubre 2015

Lic. Jessica Rossello

Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Institut Pasteur de Montevideo.

Tribunal:

Dr. Alejandro Buschiazzo (Presidente)

Dra. Carolina Márquez (Vocal)

Dr. Federico Battistoni (Vocal)

Tapa: Micrografía electrónica de *Pseudomonas aeruginosa* donde se observa el flagelo. Esta imagen fue adquirida en el servicio de microscopía electrónica de transmisión de Facultad de Ciencias. Magnificación: 25000x

Agradecimientos

A Rosario, por su paciencia y dedicación infinitas.

A Arlinet, por haberme transmitido su pasión por el tema.

A toda UByPA por el apoyo y los momentos compartidos.

A Analía, Jorge, Madelón y Maggie, por su participación directa en este trabajo y por los conocimientos transmitidos.

Al Fondo de Solidaridad, porque sin el apoyo económico que me brindaron durante mis estudios de grado no hubiera podido llegar hasta aquí.

Sin todos ellos este trabajo no hubiera sido posible.

Agencias financiadoras:

La investigación que da origen a los resultados presentados en la presente publicación recibió fondos de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación bajo los códigos FCE_3_2013_1_100344 (Fondo Clemente Estable, modalidad jóvenes investigadores) y pos_nac_2012_1_8950 (Beca de maestría).

Este trabajo también fue parcialmente financiado por una beca de finalización de maestría de la Comisión Académica de Postgrado.

ÍNDICE

I)-Resumen.....	9
II)- Introducción.....	10
1- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
1.a-Biofilms	
1.b-Apéndices de movilidad	
I-Flagelo	
II-Pili tipo IV	
1.c-Quimiotaxis	
1.d-Sistema de secreción tipo III	
2-di-GMPc	
3-Proteómica	
3.a-Estrategias proteómicas basadas en espectrometría de masa	
3.b-Protómica cuantitativa	
I-2D-DIGE	
II-Conteo de espectros	
III)-Objetivos	32
1.a-Objetivos generales	
1.b-Objetivos específicos	
IV)-Materiales y métodos.....	33
1-Cepas, plásmidos y condiciones de crecimiento	
2-Generación de la cepa PDE ⁺	
3-Cultivos celulares	
4-Ensayos de adhesión estándar	
5-Evaluación de la formación de exopolisacárido	
6-Ensayo de formación de biopelícula	

- 7-Ensayo de formación de biofilms
- 8-Determinación de niveles endógenos de di-GMPc
- 9-Ensayos de movilidad
- 10-Extracciones de pili tipo IV y flagelo
- 11-Microscopía y adquisición de imágenes
- 12-1D PAGE
- 13-Western blot
- 14-Obtención de fracciones subcelulares y optimización del protocolo de extracción de proteínas de membrana
- 15-2D PAGE y 2D DIGE
- 16-Identificación de proteínas por MALDI-TOF/TOF
- 17-Análisis proteómico por nano LC-MS/MS
- 18-Análisis estadístico de los resultados

V)-Resultados.....46

1-Comparación fenotípica de las cepas PDE⁺ y WT

- 1.1-La cepa PDE⁺ posee bajos niveles de di-GMPc
- 1.2-La cepa PDE⁺ tiene disminuida la capacidad de formación de biofilms y síntesis de EPS
- 1.3-La cepa PDE⁺ tiene disminuida la capacidad de adhesión a la superficie epitelial

2-Análisis proteómico de las cepas PDE⁺ y WT

- 2.1-Proteínas de membrana
 - a-Optimización de los protocolos de extracción de proteínas de membrana y su separación en geles bidimensionales
 - b-Análisis comparativo de la subfracción de proteínas de membrana insoluble en buffer 2D
 - c-Análisis proteómico comparativo de proteínas de membrana por 2D DIGE
 - d-Análisis proteómico cuantitativo de proteínas de membrana por LC-MS/MS
- 2.2-Exoproteínas

- a-Separación de exoproteínas en geles bidimensionales
- b-Análisis proteómico comparativo de exoproteínas por 2D DIGE
- c-Análisis proteómico cuantitativo de exoproteínas por LC-MS/MS

3-Análisis de motilidad de la cepa PDE⁺

3.1-La síntesis de proteínas del flagelo se ve reducida en la cepa PDE⁺

3.2-La funcionalidad del pili tipo IV se ve afectada en la cepa PDE⁺

VI)-Discusión.....103

VII)-Bibliografía.....114

Índice de abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	<i>Analysis of variation</i>
BVA	<i>Biological variation module</i>
DGC	<i>Diguanilate ciclase</i>
DIA	<i>Differential In Gel analysis</i>
DIGE	<i>Differential in gel electrophoresis</i>
di-GMPc	Diguanosín monofosfato cíclico
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EPS	Exopolisacárido
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
HPLC	<i>High performance liquid cromatography</i>
IAA	Iodoacetamida
L-ARA	L-Arabinosa
LASER	<i>Light amplification by stimulated emission of radiation</i>
LB	Luria-Bertani
LBA	Luria-Bertani Agar
LBR	<i>Ligand binding region</i>
LC	Liquid cromatography
MA	<i>Methyl accepting</i>
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MCP	<i>Methyl-accepting chemotaxis protein</i>
MDCK	<i>Madin Darby Canine Kidney</i>
MEM	<i>Minimal essential medium</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PAK	<i>Pseudomonas aeruginosa cepa K</i>
PBS	<i>Phosphate saline buffer</i>

PDE	<i>Phosphodiesterase</i>
pI	Punto isoléctrico
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i>
SSTT	Sistema de secreción tipo tres
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i>
TOF	<i>Time of flight</i>
TPR	Tetratricopéptido
UFC	Unidades formadoras de colonias
WT	Cepa salvaje

I-Resumen

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista que representa un problema importante a nivel de la salud, ya que es uno de los aislamientos hospitalarios más comunes. Este bacilo Gram negativo constituye además la principal causa de muerte en individuos con fibrosis quística, siendo la formación de biofilms un factor clave en la resistencia a antibióticos y la cronicidad de la infección. En este sentido, el segundo mensajero 3',5'-diguanylate cíclico (di-GMPc) juega un rol central en la transición desde un estado móvil y de vida libre a uno sésil, multicelular y asociado a superficies. En particular bajos niveles de este segundo mensajero se asocian a cepas hipermóviles e incapaces de formar biofilms mientras que niveles altos se corresponden con el fenotipo opuesto. Los niveles de di-GMPc están controlados a través de su síntesis y degradación. La síntesis de di-GMPc es, catalizada por un grupo de enzimas, las diguanilato ciclasas, mientras que la hidrólisis es catalizada por fosfodiesterasas. El genoma de *P. aeruginosa* codifica un gran número de enzimas con actividad diguanilato ciclasa y fosfodiesterasa, y en base a caracterizaciones fenotípicas de cepas donde estos genes han sido individualmente eliminados, se ha postulado que cada una de estas enzimas tiene un rol biológico diferente. En este trabajo nos centramos en una fosfodiesterasa en particular, codificada por el gen *PA2133*. Datos previos indican que esta enzima cumple un rol fundamental en la regulación de la formación de biofilms, biopelículas y la citotoxicidad mediada por el sistema de secreción tipo III, dos procesos relacionados a la adhesión de bacterias a superficies abióticas y bióticas. Con el fin de caracterizar a nivel molecular la regulación de estos procesos por el gen *PA2133* generamos una cepa que sobreexpresa esta enzima y llevamos a cabo estudios proteómicos comparativos. Utilizando dos estrategias proteómicas complementarias (DIGE y *shotgun*) demostramos que la cepa que sobreexpresa la proteína PA2133 posee severamente afectados cuatro procesos o estructuras centrales en la patogénesis: la adhesión a superficies bióticas y abióticas, la movilidad, el sistema de secreción tipo III y la quimiotaxis. Algunos de estos resultados son esperados para una cepa con bajos niveles de di-GMPc y se enmarcan dentro del modelo actual. Sin embargo, de este trabajo surgen nuevos procesos regulados por este segundo mensajero e incluso algunos resultados que cuestionan el modelo vigente así como nuestro entendimiento sobre la regulación mediada por di-GMPc.

II-INTRODUCCIÓN

1-*Pseudomonas aeruginosa*

En 1882, el farmacéutico y bacteriólogo del Institut Pasteur (París, Francia), Carle Gessard, llevó a cabo el trabajo titulado "*On the blue and green colorations that appears in bandages*" (Gessard 1882). Intrigado por el color azul verdoso de algunos apósitos llevó a cabo el aislamiento de un patógeno productor de los pigmentos pioverdina y piocianina. En este trabajo Gessard caracterizó fisicoquímicamente a la piocianina y describió al patógeno que la producía como un organismo aeróbico, de 1-1,5µm de tamaño, muy móvil y capaz de crecer en diversos fluidos biológicos. Este patógeno, originalmente denominado *Bacillus pyocyaneus*, es la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, un bacilo Gram negativo de amplia distribución en el ambiente y que presenta una gran versatilidad en lo que respecta al uso de sustratos como fuente de carbono y nitrógeno.

P. aeruginosa es capaz de infectar tanto animales como plantas, aunque habitualmente no causa efectos nocivos para la salud humana. Sin embargo, en caso de existir daño tisular o inmunocompromiso *P. aeruginosa* es capaz de producir infección e incluso de causar la muerte. Esta bacteria oportunista representa un problema importante a nivel de la salud, ya que es uno de los patógenos intra-hospitalarios más comunes (Joseph et al 2010, McGrath & Asmar 2011, Toddard 2008). Se presenta frecuentemente en pacientes cateterizados, quemados severos, trasplantados, pacientes con respiradores artificiales, aquellos que reciben quimioterapia y los que padecen de SIDA (Engel 2003, Joseph et al 2010, Lopez & Cortes 2012, McGrath & Asmar 2011). Fuera del ambiente hospitalario, puede producir úlcera de córnea en usuarios de lentes de contacto, endocarditis en individuos consumidores de drogas intravenosas, y es una de las principales causas de infecciones crónicas y muerte en individuos que padecen de fibrosis quística (Mandell 2000).

P. aeruginosa posee múltiples características que la hacen un patógeno difícil de atacar. Entre ellas se destacan: necesidades nutricionales mínimas que le permiten habitar casi cualquier ambiente (es capaz de crecer en jabón, desinfectantes, agua destilada, etc.), la aparición de cepas multirresistentes a antibióticos y la capacidad de formación de biofilms.

1.a-Biofilms

Los biofilms son comunidades bacterianas inmersas en una matriz de exopolisacárido de producción propia, capaces de tolerar las dosis de antibiótico efectivas para bacterias individuales y que se encuentran asociadas a una superficie biótica o abiótica (Harmsen et al 2010, Klausen et al 2003). La formación de biofilms es una estrategia utilizada por muchas bacterias patógenas y no patógenas que se ha visto implicada en fenómenos tales como la supervivencia, el aumento de virulencia y la resistencia a antibióticos (Harmsen et al 2010, Klausen et al 2003). En el caso particular de las infecciones, la formación de biofilms suele representar un obstáculo para el tratamiento. Una hipótesis que explica este fenómeno es que la matriz de exopolisacárido impone una barrera física a la difusión del antibiótico y de las células efectoras del sistema inmune que trabajan conjuntamente en la eliminación de patógenos. Dado que el hospedero no es capaz de erradicar eficazmente la infección, los procesos infectivos asociados a biofilms suelen ser crónicos (Lasa et al 2005).

El proceso de formación de biofilms consta de diferentes pasos o estadíos, siendo la transición desde una forma de vida planctónica a una asociada a superficie un paso temprano clave (Harmsen et al 2010, Klausen et al 2003). Actualmente se conoce muy poco sobre las características de esta transición, especialmente cuando se trata de la formación de biofilms sobre superficies bióticas. En nuestro grupo de trabajo hemos visto que cuando se infectan células epiteliales polarizadas con *P. aeruginosa* en fase de crecimiento estacionaria rápidamente se forman agregados sobre la superficie de las mismas (figura 1) (Lepanto et al 2011). Estos agregados no se encuentran preformados en cultivo sino que se forman *de novo* sobre la superficie celular (figura 2) (Lepanto et al 2011).

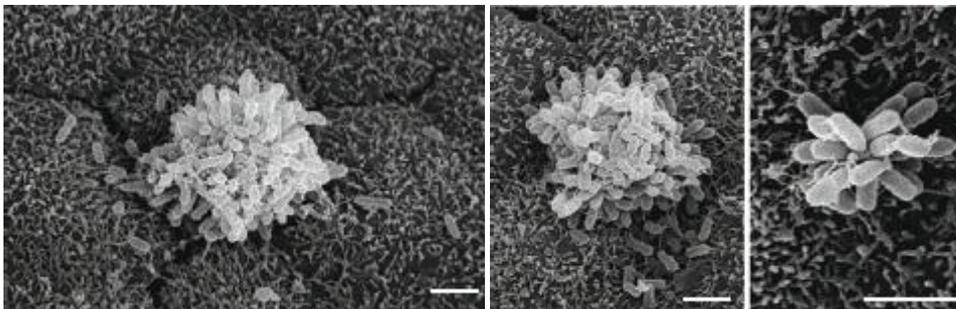


Figura 1. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de agregados de *P. aeruginosa* formados sobre la superficie apical de células MDCK. La barra de escala representa 2 μ m.

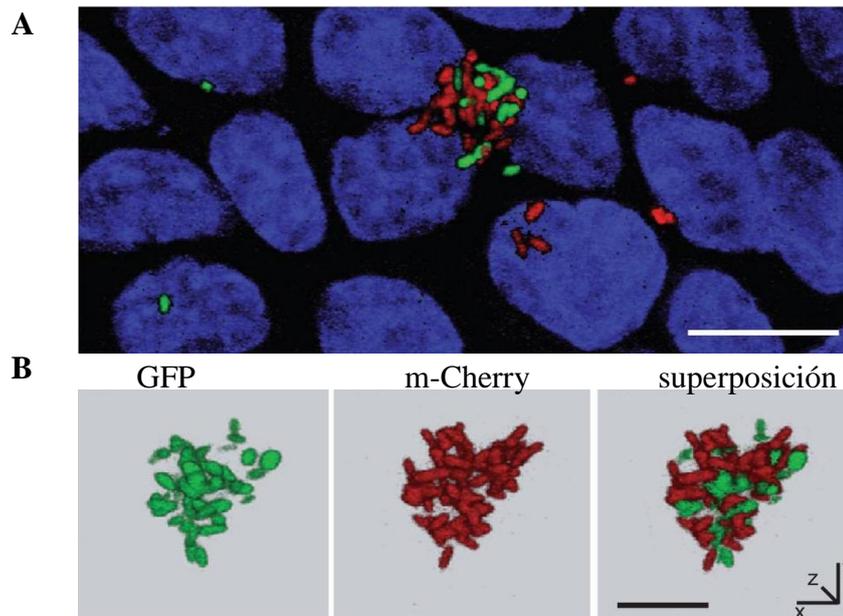


Figura 2. Imágenes de microscopía confocal de agregados de *P. aeruginosa* formados sobre la superficie epitelial. Células MDCK fueron co-infectadas con cultivos de *P. aeruginosa* que expresan establemente GFP o m-Cherry. Los agregados formados poseen ambos tipos de bacteria lo que indica no se encontraban preformados en cultivo. Los núcleos fueron teñidos con TOPRO. Barra de escala A: 10 μ m. B: 5 μ m (Lepanto et al 2011)

En este sentido, un trabajo reciente indica que estos agregados poseen características típicas de los biofilms, como matriz extracelular de exopolisacárido y elevada resistencia al tratamiento con antibióticos (Tran et al 2014). Mediante video microscopía confocal nuestro grupo de trabajo observó que los mismos se forman por reclutamiento de bacterias que nadan libremente (Lepanto et al 2011). El estudio de la dinámica del proceso de formación muestra que se generan en un período que ronda los 10 minutos. En primera instancia, una bacteria individual se une a la célula hospedadora y permanece allí por varios minutos. Luego de este período se dispara el reclutamiento y adhesión colectiva de bacterias que da lugar a la formación del agregado (Lepanto et al 2011). Si bien los mecanismos moleculares involucrados en la adhesión y reclutamiento temprano sobre superficies bióticas son aún poco comprendidos, se han identificado estructuras y vías de regulación que son claves en estos procesos. Existen múltiples evidencias de que apéndices bacterianos como el pili tipo IV, el flagelo y el sistema de secreción tipo III (SSTT) juegan un papel crucial en estos procesos (Klausen et al 2003, Tran et al 2014). En este sentido, en los últimos tiempos ha cobrado gran relevancia el segundo mensajero 3',5'-diguanylate cíclico (di-GMPc) como una molécula central en la regulación de estos apéndices, así como en la transición de un estado de vida móvil a uno sésil y asociado a superficie (Romling et al 2013).

1.b-Apéndices de movilidad

I- Flagelo

El flagelo es una estructura multiproteica altamente compleja, de unos 15-20 nm de diámetro y varios μm de largo, cuya síntesis y funcionalidad requieren de la expresión de alrededor de 50 genes (Macnab 2003, Shapiro 1995, Wolfe & Visick 2008).

P. aeruginosa posee un único flagelo polar, que permite a la bacteria moverse en medio líquido a expensas de ATP y responder a la presencia de diversos compuestos (quimiotaxis) (Kato et al 2008, Sampedro et al 2015, Wadhams & Armitage 2004).

El flagelo está compuesto por varias unidades funcionales (Macnab 2003, Shapiro 1995, Wolfe & Visick 2008) (figura 3):

Un cuerpo basal, formado por los siguientes componentes:

-una serie de anillos insertos en la membrana interna denominados "anillos MS", compuestos por subunidades de FliF.

-un tubo que atraviesa el peptidoglicano denominado "anillo P", compuesto por subunidades de FliI.

-un anillo inserto en la membrana externa denominado "anillo L" compuesto por subunidades de FliH

-un tubo distal formado por FlgF y FlgG y un tubo proximal formado por FlgB, FlgC y FliE. Estos tubos atraviesan el periplasma y conectan el cuerpo basal con el *hook*.

Un motor generador de torque, dividido en dos subunidades funcionales: Un rotor y un estator. El rotor está formado por subunidades de FliG que interaccionan en forma no covalente con el anillo MS. El estator está formado por las proteínas transmembrana MotA y MotB, que interaccionan con el cuerpo basal y la capa de peptidoglicano

Un interruptor que permite invertir el sentido de giro del flagelo. El mismo está compuesto por las proteínas FliG, FliM y FliN, que en conjunto forman el "anillo C".

Un conector que actúa de gancho o *hook*, un cilindro hueco compuesto por FlgE, a través del cual pasan los componentes del filamento flagelar.

Un filamento flagelar helicoidal, hueco, equivalente a la propela de un barco: el movimiento en sentido antihorario permite a la bacteria moverse hacia adelante mientras que el movimiento en sentido horario le permite cambiar de dirección (*tumbling*) (Shapiro 1995). El filamento flagelar en *P. aeruginosa* puede estar compuesto por dos tipos diferentes de flagelina dependiendo de la cepa: de tipo A, o de tipo B (FliC).

Proteínas de unión y proteínas de tipo "tapón" o capping: Las proteínas de unión FlgL y FlgK anclan el filamento flagelar al *hook*. Por otra parte, FliD, la proteína de *capping* se encuentra en el extremo más distal del filamento flagelar y su función es evitar la depolimerización del mismo.

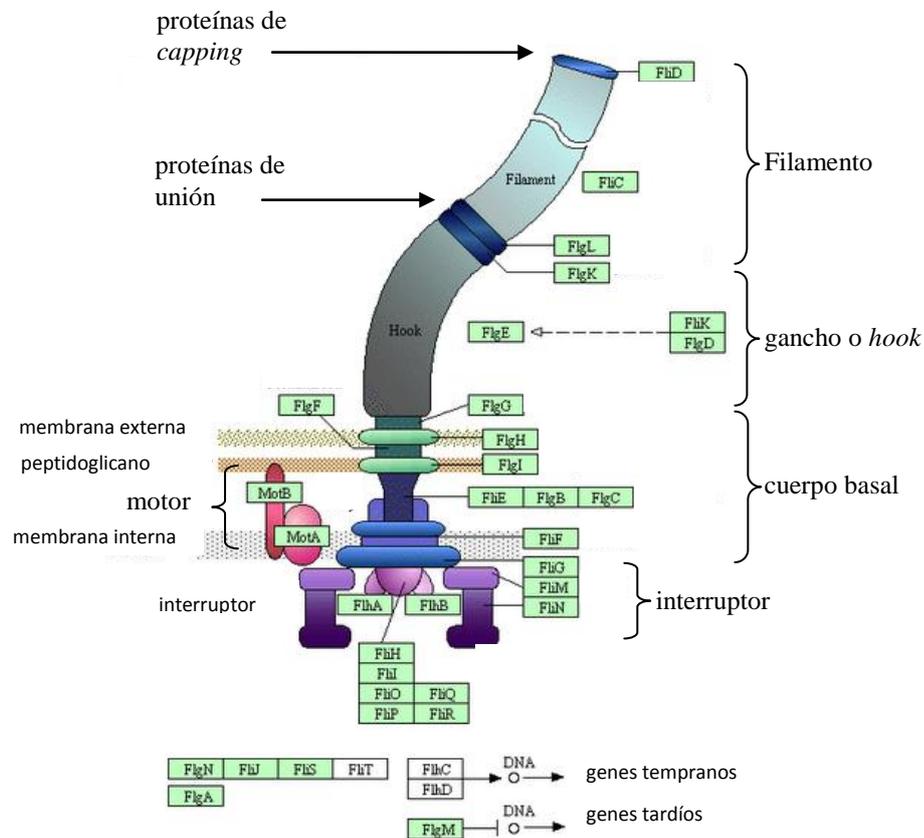


Figura 3. Esquema del flagelo donde se encuentran indicadas las distintas subunidades funcionales y sus componentes. Tomado de KEGG <http://www.genome.jp/kegg>

La expresión de proteínas del flagelo es un proceso jerarquizado (Kutsukake et al 1990). Las proteínas se pueden agrupar en 3 grupos según el momento de su transcripción: tempranas, intermedias y tardías. Entre las proteínas tempranas se encuentran los activadores transcripcionales FlhD y FlhC. El grupo de proteínas que se expresan a tiempos intermedios está compuesto por proteínas implicadas en la formación del cuerpo basal y el *hook* mientras que las tardías son aquellas proteínas que participan en la formación del motor y el filamento flagelar (Kutsukake et al 1990). Por otra parte, mientras que los componentes insertos en membrana son secretados a través de la vía

II-Pili tipo IV

El pili tipo IV es un apéndice compuesto por múltiples filamentos localizados en forma polar. Posee alrededor de 5 nm de diámetro y de 1-4 μm de largo en promedio, aunque puede superar los 10 μm (Ramos 2006). Es responsable de la movilidad denominada *twitching*, en contraposición a *swimming* que es la movilidad dependiente de flagelo. En la movilidad de tipo *twitching* la bacteria se traslada sobre superficies sólidas a través ciclos de extensión y retracción del pili, mientras que la movilidad de tipo *swimming* se da en medio líquido como consecuencia de la rotación del flagelo (figura 4) (Kearns 2010).

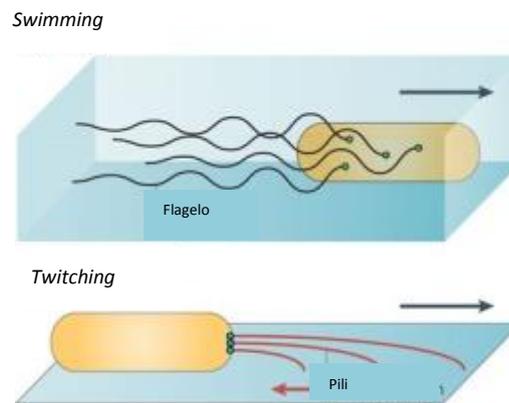


Figura 4. Esquema que ejemplifica los movimientos dependientes de flagelo (*swimming*) y pili tipo IV (*twitching*). Adaptado de Kerns *et al.*, 2010

Como ya se mencionó, el pili tipo IV también es una estructura clave en la adhesión a superficies y formación de biofilms, así como un importante factor de virulencia en *P. aeruginosa* (Klausen *et al* 2003, Tran *et al* 2014). Si bien esta estructura ha sido menos caracterizada que el flagelo, se sabe que unos 40 genes participan en su biogénesis y regulación (Bertrand *et al* 2010, Burrows 2012, Mattick 2002). Los componentes más importantes del pili tipo IV se resumen en la figura 5. El mismo está compuesto por cuatro subunidades funcionales o subcomplejos (Burrows 2012, Ramos 2004):

Complejo de membrana externa, compuesto por una secretina y su pilotina. La secretina está compuesta por dodecámeros de PilQ y forma un canal inserto en la membrana externa a través del cual pasa la fibra del pili. La pilotina PilF, es una lipoproteína responsable del correcto posicionamiento de PilQ en la membrana así como de su oligomerización.

Complejo motor de membrana interna, compuesto por una proteína de plataforma inserta en la membrana, PilC, a la cual se anclan las proteínas citosólicas que actúan

como pilina polimerasa (PilB) y depolimerasa (PilT). Tanto PilB como PilT son ATPasas y se cree que su actividad es modulada por otra ATPasa, PilU. Finalmente, PilD, la peptidasa de prepilina, es una enzima inserta en la membrana interna, requerida para la degradación del péptido líder de la pilina (la subunidad estructural del filamento del flagelo) así como para la metilación de su fenilalánina N- terminal.

Complejo de alineamiento, que conecta al complejo motor de membrana interna con el complejo de membrana externa y se extiende a través del periplasma, asegurando el correcto posicionamiento de la fibra del pili. Está compuesto por las proteínas PilM, PilN, PilO, PilP (cuya función es poco entendida pero poseen homología con proteínas del complejo de alineamiento del sistema de secreción tipo II) y FimV, una proteína de 97 KDa, que es fundamental para el ensamblaje de la secretina y se cree que remodela peptidoglicano para permitir el pasaje de subunidades de PilQ así como el anclaje de los componentes del pili.

Filamento del pili, compuesto por subunidades de PilA y otras pilinas minoritarias, que son preprocesadas en su extremo N terminal por PilD previo a su ensamblaje.

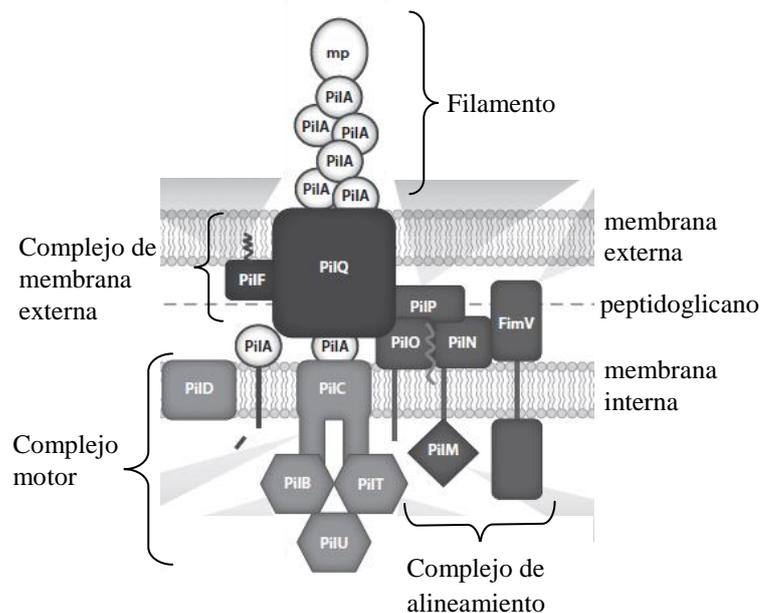


Figura 5. Esquema del pili tipo IV donde se encuentran indicados los principales componentes. Adaptado de Burrows 2012

Tanto el flagelo como el pili tipo IV poseen sistemas quimiosensores asociados. En conjunto, estos sistemas le permiten a la bacteria responder frente a estímulos químicos a través de sus estructuras de movilidad. Las histidín kinasas asociadas a estos sistemas quimiosensores se denominan CheA y ChpA respectivamente. A continuación se detalla brevemente el conocimiento actual sobre dichos sistemas.

1.c-Quimiotaxis

P. aeruginosa es capaz de sensar la presencia de compuestos de naturaleza variada en el medio y responder a cambios en la concentración de los mismos a través del redireccionamiento en su movimiento. Este redireccionamiento es orquestado por las dos principales estructuras de movilidad de *P. aeruginosa*: el flagelo y el pili tipo IV. Esto le permite moverse hacia zonas con altas concentraciones de nutrientes, colonizar hospederos (en forma parasitaria o simbiote) y generar una respuesta de repulsión frente a la presencia de estímulos químicos potencialmente nocivos (Kato et al 2008, Sampedro et al 2015).

Los cambios en el direccionamiento están orquestados a través de receptores de quimiotaxis denominados *Methyl accepting-chemotactic proteins* (MCPs). Los MCPs son proteínas de membrana interna que salvo raras excepciones (como el receptor de aerotaxis) poseen un dominio periplásmico de unión a ligando (*Ligand-binding region*, LBR). Adicionalmente estas proteínas presentan un dominio citosólico altamente conservado de recepción de grupos metilo (*Methyl-accepting*, MA) que es utilizado como criterio de anotación de MCPs (Ferrandez et al 2002). Si bien *P. aeruginosa* codifica 26 MCPs en su genoma, sólo se conoce la función de 13 de estas proteínas (Croft et al 2000, Kato et al 2008, Stover et al 2000). Cabe destacar que de estos 26 MCPs sólo uno (PilJ) se ha visto involucrado en la quimiotaxis dependiente del pili tipo IV; el resto participa en la quimiotaxis dependiente de flagelo (Kato et al 2008, Sampedro et al 2015).

La respuesta de quimiotaxis ha sido observada para compuestos de naturaleza variada como ser aminoácidos, fosfato inorgánico, lípidos, oxígeno, etileno, benceno, tolueno, phenol, ácidos dicarboxílicos y tricarboxílicos (citrato, malato, succinato), oligopéptidos azúcares, vainillina, vainillato, nitrato y nitrito. Muchos de ellos son componentes naturales de exudados vegetales y secreciones animales (Kato et al 2008), lo que refleja la importancia de la respuesta de quimiotaxis en el establecimiento de la relación con el hospedero.

Como se mencionó anteriormente, la unión de un ligando al dominio periplásmico del receptor MCPs desencadena una señal que es transmitida al flagelo o al pili tipo IV. La transmisión de esta señal ha sido extensamente caracterizada para el circuito del flagelo. En forma resumida, este sistema cuenta con 4 componentes fundamentales (Sampedro et al 2015, Wadhams & Armitage 2004):

Un módulo sensor, compuesto por receptores MCP, que unen al ligando y participan en la respuesta adaptativa. Como consecuencia sufren cambios en el estado de metilación de residuos de glutamato.

Un módulo de transducción, formado por el receptor MCP, la proteína adaptadora CheW y la histidina quinasa CheA. Como consecuencia de la unión del ligando al MCP, se modifica la actividad autoquinasa de CheA. CheA transfiere el grupo fosfato a los reguladores de respuesta CheB y CheY que forman parte de los módulos ejecutor y de retroalimentación.

Un módulo ejecutor representado por el regulador de respuesta CheY, que actúa directamente sobre el motor flagelar. La forma fosforilada de este regulador de respuesta interacciona con las proteínas del interruptor del flagelo (ver figura 3) favoreciendo la rotación del flagelo en sentido horario y como consecuencia, un cambio en la dirección del movimiento.

Un módulo de retroalimentación que modula el estado de metilación del dominio citosólico del MCP. Está compuesto por una metiltransferasa (CheR) que se encuentra constitutivamente activa y una metilesterasa (CheB) que se activa en respuesta a la fosforilación por CheA.

La figura 6 muestra un esquema del circuito de quimiotaxis dependiente de flagelo. El mismo involucra alrededor de 20 genes del sistema Che, distribuidos en 5 *clusters*. Si bien esta vía ha sido poco caracterizada para el pili tipo IV, se cree que la misma es similar a la descrita para el flagelo, ya que algunos de los genes pertenecientes al cluster Pil-Chp (involucrado en la biogénesis del pili) presentan homología de secuencia con proteínas pertenecientes a los 4 módulos descriptos para el sistema Che (Bertrand et al 2010, Leech & Mattick 2006, Whitchurch et al 1991, Whitchurch et al 2004).

1.d-Sistema de secreción tipo III

El sistema de secreción tipo III (SSTT) es uno de los principales determinantes de virulencia en *P. aeruginosa*. Es una estructura evolutivamente relacionada al flagelo, similar a una jeringa que se encuentra inserta en las membranas interna y externa de la bacteria (Galle et al 2012, Hauser 2009). Esta estructura atraviesa el espacio extracelular y perfora la membrana plasmática del hospedero liberando exotoxinas en el citoplasma del mismo. En su biosíntesis y regulación participan alrededor de 40 genes distribuidos en 5 operones (Galle et al 2012, Hauser 2009).

Estructuralmente se puede dividir al SSTT en 4 subcomplejos (ver figura 7):

El Complejo aguja o inyectisoma es la estructura responsable del transporte de los efectores al citoplasma del hospedero. Está constituido por un cuerpo basal y el filamento de la aguja:

-El cuerpo basal está formado por dos anillos, uno inserto en la membrana interna, formado por la proteína PscJ y una secretina inserta en la membrana externa, formada por PscC.

-El filamento de la aguja está principalmente formado por subunidades de PscF que se ensamblan en un filamento hueco a través del cual viajan los efectores y así como componentes del translocador. Además de permitir la translocación de los efectores, el filamento de la aguja actúa como sensor para el contacto con la célula hospedera (Galle et al 2012, Hauser 2009).

El translocador se ensambla en el extremo distal del inyectisoma, formando un poro que se inserta en la membrana del hospedero. El poro está compuesto por PopB y PopD, mientras la proteína PcrV forma una plataforma que une dicho poro con el filamento de la aguja, minimizando la liberación de exotoxinas al medio extracelular (Galle et al 2012, Hauser 2009). En condiciones en las que no hay contacto con la célula hospedera, la secreción basal de efectores al medio extracelular es muy baja, siendo menor al 0,1% de la toxina producida por la bacteria (Sundin et al 2004).

Cuatro **exotoxinas o efectores** son translocados a través del sistema de secreción tipo tres: ExoS, ExoT, ExoU y ExoY. Curiosamente, ninguna cepa cuenta con las cuatro toxinas ya que ExoS y ExoU son mutuamente excluyentes (Feltman et al 2001).

ExoS y ExoT poseen 76% de homología de secuencia. A través de sus actividades ADP ribosil transferasa y GAP (*GTPase activating protein*) provocan la depolimerización del citoesqueleto de actina e inducen la muerte celular por apoptosis. ExoU posee actividad

fosfolipasa e induce la lisis celular mientras que ExoY posee actividad adenilato ciclasa y su función en la patogénesis es aún desconocida (Galle et al 2012, Hauser 2009).

Chaperonas: Existen tres tipos de chaperonas que se asocian a las diferentes proteínas del SSTT. Las de clase I asisten a las proteínas formadoras de poros, las de clase II a las que forman el inyectisoma, y por último las de clase III asisten el plegamiento de los efectores y los mantienen en estado inactivo mientras permanecen en el citosol de la bacteria (Galle et al 2012, Hauser 2009).

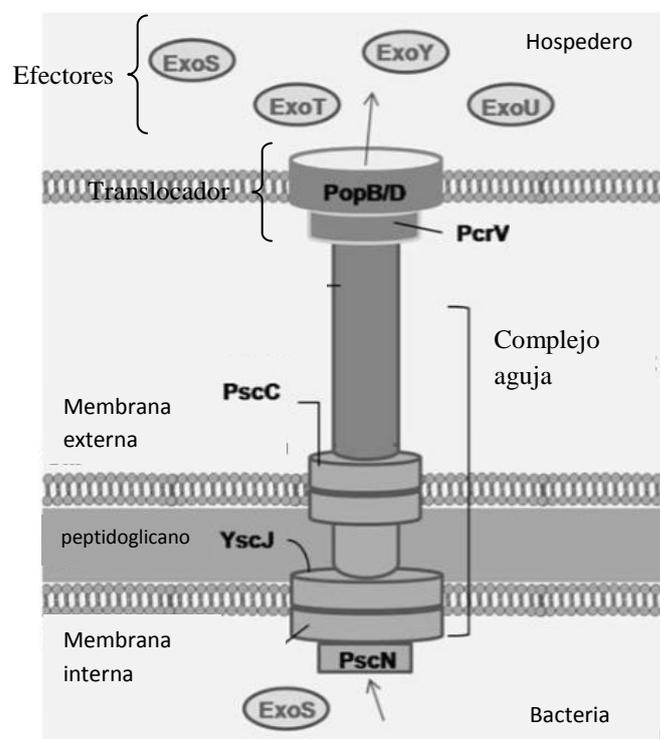


Figura 7. Esquema del sistema de secreción tipo III donde se indican sus principales componentes. Adaptado de Galle *et al*, 2012.

2-di-GMPc

Los mecanismos que regulan la transición entre un estado de alta movilidad hacia uno sésil y asociado a superficie son poco conocidos. En este sentido, se ha visto que el 3',5'-diguanylate cíclico (di-GMPc), un segundo mensajero ubicuo en bacterias, posee un rol clave en comportamientos multicelulares y de unión a superficies. El modelo actual sostiene que altos niveles de di-GMPc se corresponden con un estado sésil, multicelular y asociado a superficie mientras que bajos niveles se corresponderían con un estado móvil y de vida libre (figura 8) (Hengge 2009, Hengge 2013, Jenal & Malone 2006, Romling et al 2013, Ryan et al 2006). Si bien los blancos moleculares específicos involucrados en la señalización por di-GMPc han sido poco caracterizados, existen evidencias de que este segundo mensajero ejerce su acción a distintos niveles. Se ha visto que el di-GMPc es capaz de actuar a nivel de la transcripción, modificando la unión de factores de transcripción al ADN (Fazli et al 2011, Hickman & Harwood 2008, Zhang 2010). En algunas especies se ha visto que el di-GMPc se une a la región 5'UTR del ARNm, controlando el proceso de traducción (Lee et al 2010, Sudarsan et al 2008). Por último, se ha visto que el di-GMPc es capaz de modular la actividad de proteínas, por ejemplo induciendo cambios conformacionales a través de su unión con dominios PilZ presentes en las mismas (Amikam & Galperin 2006, Ryjenkov et al 2006)

Los niveles de di-GMPc son dinámicamente regulados mediante síntesis y degradación. La síntesis es catalizada por un grupo de enzimas, las diguanylate ciclasas (DGC) que poseen un dominio GGDEF, mientras que la degradación es catalizada por fosfodiesterasas (PDE), típicamente conteniendo dominios EAL o HD-GYP (Hengge 2009, Hengge 2013, Jenal & Malone 2006, Romling et al 2013, Ryan et al 2006). Las proteínas con dominios GGDEF y EAL pueden clasificarse en tres tipos: I-aquellas que poseen GGDEF o variantes que conservan su actividad DGC (como los GGEEF); II-aquellas que poseen dominios EAL o variantes que conservan su actividad fosfodiesterasa (como los EVL y ETL); III-aquellas que poseen ambos dominios. Trabajos recientes han demostrado que las proteínas de tipo III tendrían un rol regulatorio: si bien conservan su capacidad de unión a di-GMPc carecen de actividad enzimática en al menos uno de sus dominios (Kulasakara et al 2006).

Muchas DGCs y PDEs poseen dominios adicionales que sensan señales ambientales, lo que sugiere que su actividad (y por tanto los niveles de di-GMPc) es regulada directa o indirectamente por señales del entorno (Filloux 2012, Ryan et al 2006). Entre éstos se encuentran dominios PAS que se unen a flavinas o hemo y que podrían sensar oxígeno

o potencial redox, dominios GAF que unen mononucleótidos o moléculas pequeñas, dominios BLUF que sensan luz azul y dominios REC presentes en reguladores de respuesta que forman parte de sistemas de dos componentes entre otros.

Tempranamente se demostró que tanto la formación de biofilms como la transición desde un estado de vida móvil a uno sésil, son procesos regulados por di-GMPc. **En general, altos niveles de di-GMPc estimulan la producción de componentes de la matriz extracelular e inhiben la movilidad dependiente de pili y flagelo, mientras que bajos niveles promueven la movilidad e inhiben la síntesis de matriz** (Hickman et al 2005, Kader et al 2006, Kuchma et al 2007, Lim et al 2007, Merritt et al 2007, Ross et al 1987, Simm et al 2004, Tischler & Camilli 2005).

En este sentido, un gran número de reportes asocian altos niveles de di-GMPc a una movilidad reducida, mientras que bajos niveles de este segundo mensajero se asocian a cepas hipermóviles (Hickman et al 2005, Kader et al 2006, Kuchma et al 2007, Lim et al 2007, Merritt et al 2007, Simm et al 2004, Tischler & Camilli 2005). El control de la movilidad por di-GMPc se da a través de la regulación de la expresión de proteínas así como del funcionamiento de los apéndices de movilidad. Por citar algunos ejemplos, en *E. coli*, la eliminación del genoma de la fosfodiesterasa YhjH genera una cepa con niveles elevados de di-GMPc y baja movilidad como consecuencia de la funcionalidad de flagelo alterada (Girgis et al 2007). En *V. cholerae*, la sobreexpresión de la DGC CdgF causa una disminución en la movilidad dependiente del flagelo (Beyhan et al 2006) mientras que en *P. atrosepticum*, la sobreexpresión de dos PDEs genera un aumento en la movilidad dependiente de flagelo (Tan et al 2014).

Por otra parte, se ha visto en varias bacterias que altos niveles de di-GMPc inhiben la síntesis de proteínas del flagelo, mediante el bloqueo de la unión de activadores transcripcionales al ADN (Chin et al 2010, Hickman & Harwood 2008, Krasteva et al 2010, Leduc & Roberts 2009). El primer factor regulador de la síntesis de flagelo en forma dependiente de di-GMPc, FleQ, se identificó en *P. aeruginosa*. FleQ es el principal activador transcripcional de los genes del flagelo y represor de genes implicados en la síntesis de exopolisacárido. (Hickman & Harwood 2008). En respuesta a altos niveles de di-GMPc, FleQ se disocia de sus sitios de unión al ADN desreprimiendo la transcripción de los genes que participan en la síntesis de exopolisacárido y suprimiendo la activación de los genes del flagelo. (Arora et al 1997, Borlee et al 2010, Hickman & Harwood 2008, Hickman et al 2005).

Por otro lado, en algunas bacterias se ha reportado que los niveles de di-GMPc son capaces de regular el funcionamiento del flagelo a través de la modulación del sistema de quimiotaxis (Russell et al 2013, Sultan et al 2011). En este mismo sentido, se ha visto que algunos MCPs de *A. brasilensis* y *P. aeruginosa* contienen dominios de unión a di-GMPc (Duvel et al 2012, Russell et al 2013). Además, mediante análisis bioinformáticos se ha predicho la existencia de dominios de unión a di-GMPc en receptores MCP de otras bacterias (Russell et al 2013). Sin embargo el rol que la interacción con di-GMPc tiene sobre la funcionalidad de los receptores MCP es aún desconocida.

Otro fenotipo típicamente asociado a di-GMPc es la formación de biofilms. La dependencia entre los niveles de di-GMPc y la formación de biofilms ha sido ampliamente evaluada en diversos organismos mediante el uso de distintos modelos y trasfondos genéticos, como ser la sobreexpresión o eliminación de PDEs o DGCs (Borlee et al 2010, Jimenez-Fernandez et al 2015, Kader et al 2006, Kirillina et al 2004, Merritt et al 2007, Nakhamchik et al 2008, Simm et al 2004, Thormann et al 2006). Por ejemplo, en *P. aeruginosa*, ocurre un aumento en la síntesis de componentes de la matriz extracelular y formación de biofilms en respuesta a un aumento en los niveles de di-GMPc. Este comportamiento es independiente de si el aumento en los niveles de di-GMPc se alcanza a través de la activación de una DGC o la eliminación de una PDE (Borlee et al 2010, Jimenez-Fernandez et al 2015) ya que, tanto la sobreexpresión de una PDE como la eliminación de una DGC, generan cepas con bajos niveles de di-GMPc y capacidad de formación de biofilms reducida (Borlee et al 2010, Kuchma et al 2007, Merritt et al 2007).

En los últimos tiempos el di-GMPc también ha cobrado importancia como una molécula con un rol fundamental en la virulencia y citotoxicidad (Filloux 2012, Romling et al 2013, Ryan et al 2006). Sin embargo, el sentido en que este segundo mensajero regula dichos procesos aún no ha sido establecido. En *V. cholerae* la expresión de la toxina colérica es promovida por bajos niveles de di-GMPc y altos niveles generan una cepa avirulenta en modelos de ratón (Tischler & Camilli 2005). En este mismo sentido, cepas de *Y. pestis* y *B. burgdorferi* con altos niveles de di-GMPc, poseen menor virulencia en modelos de ratón. (Bobrov et al 2011, He et al 2011, Solano et al 2009, Sultan et al 2011) Sin embargo este comportamiento no parece ser universal, ya que en algunas bacterias como *X. campestris* y *P. aeruginosa* no se pudo establecer una correlación

directa entre la virulencia y los niveles de di-GMPc (Kulasakara et al 2006, Ryan et al 2007).

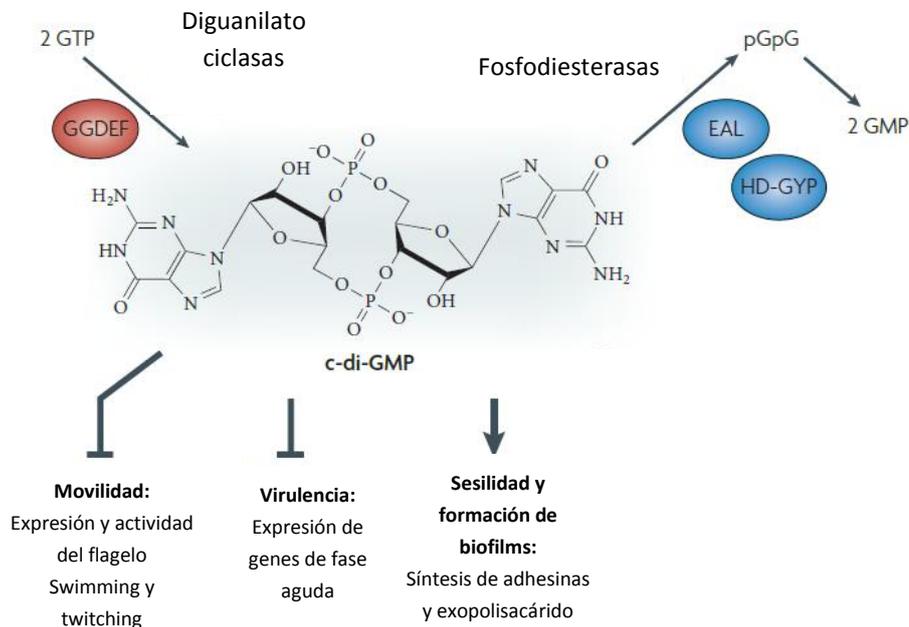


Figura 8. Esquema de los principales procesos regulados por di-GMPc. Adaptado de Hengge *et al*, 2009

El genoma de *P. aeruginosa* codifica múltiples proteínas para el control de los niveles de di-GMPc: 17 de ellas corresponden a enzimas con dominios DGC, 5 poseen dominios PDE y 16 poseen ambos dominios (Kulasakara et al 2006). La amplia mayoría de estos genes se encuentran presentes en las cepas circulantes, y son parte del genoma estable de *P. aeruginosa*. Esta gran cantidad de proteínas, sugiere que las vías de señalización por di-GMPc son muy complejas. Con el fin de caracterizar las vías de señalización mediadas por di-GMPc, Kulasakara y colaboradores llevaron a cabo un estudio con cepas de *P. aeruginosa* donde cada una de las proteínas conteniendo dominios EAL o GGDEF fue individualmente eliminada. Un hallazgo llamativo de este estudio fue el hecho de que la eliminación de cada uno de estos genes en forma individual genera cepas con fenotipos muy diferentes en lo que respecta a la capacidad de formación de biofilms y citotoxicidad (Kulasakara et al 2006). Este mismo efecto fue observado tanto para la sobreexpresión de PDEs como de DGCs individuales (Kulasakara et al 2006). La sobreexpresión de algunas fosfodiesterasas tiene muy poco efecto sobre la capacidad de las cepas de formar biofilms, mientras que la sobreexpresión de otras produce un efecto drástico. En este sentido, la sobreexpresión

de una PDE en particular, codificada por el gen *PA2133*, inhibe fuertemente la formación de biofilms (Hickman et al 2005) y biopelículas así como la citotoxicidad dependiente del sistema de secreción tipo III (SSTT) (Hickman et al 2005, Kulasakara et al 2006). *PA2133* es una proteína de 32 kDa, codificada en el operón fimbrial *cup* y que contiene una variante del dominio fosfodiesterasa típico, ya que el sitio activo es ETL en vez de EAL. Esta proteína es capaz de degradar di-GMPc *in vitro* y su sobreexpresión en *P. aeruginosa* genera una cepa con muy bajos niveles de di-GMPc (Hickman et al 2005, Kulasakara et al 2006).

Con el fin de profundizar en los mecanismos por los cuáles el di-GMPc regula aspectos claves en la patogenicidad de *P. aeruginosa*, nos centramos en el estudio de la fosfodiesterasa *PA2133*. Generamos una cepa que sobreexpresa esta enzima (cepa a la que denominamos PDE⁺) y realizamos un análisis comparativo con la cepa WT a nivel fenotípico y molecular utilizando herramientas de proteómica cuantitativa.

3-Proteómica

El proteoma representa el conjunto de proteínas expresadas por un organismo en una situación dada. En comparación al genoma, el proteoma es altamente dinámico y se modifica en respuesta a diferentes condiciones ambientales. Desde el punto de vista analítico, un análisis proteómico posee asociada la complejidad de buscar, identificar y caracterizar un conjunto de analitos que se encuentran presentes en muy diferentes concentraciones y poseen propiedades fisicoquímicas muy diversas. En este sentido la espectrometría de masa surge como una técnica altamente sensible que permite abordar este tipo de análisis.

3.a-Estrategias proteómicas basada en espectrometría de masa

La espectrometría de masa es una técnica muy sensible que permite determinar con alta precisión y exactitud la relación masa/carga (m/z) de iones moleculares en fase gaseosa. Esta técnica no sólo permite obtener información acerca de la masa molecular de las macromoléculas sino que también permite elucidar aspectos estructurales de las mismas (Aebersold & Goodlett 2001, Godovac-Zimmermann & Brown 2001). En particular, la aplicación de la espectrometría de masa al estudio de péptidos y proteínas ha sido posible gracias al desarrollo de métodos de ionización suave como la desorción/ionización por láser asistida por una matriz (MALDI) y la ionización por electrospray (ES). (Costello 1999).

La estrategia más utilizada para identificar proteínas por espectrometría de masa se basa en la digestión de las mismas usando enzimas específicas, seguida de la determinación de la relación masa/carga (m/z) de los péptidos generados. Este conjunto de valores constituye la huella peptídica de una proteína (Mann et al 2001). Los péptidos generados por digestión pueden ser además fragmentados dentro del equipo, generando espectros de MS/MS, que contienen información de secuencia. En conjunto los valores de m/z de un péptido y su fragmentación, aportan una información valiosa que puede ser utilizada para la identificación de proteínas por comparación con bases de datos de secuencia del organismo en estudio (Baldwin 2004). Para ello se utilizan motores de búsqueda que permitan realizar comparaciones entre los datos obtenidos y los datos teóricos con el fin de asignar una secuencia de aminoácidos a cada valor de m/z en forma estadísticamente significativa (Baldwin 2004). Por tanto, la identificación de proteínas por espectrometría de masa es un proceso estadístico y asociado a un *score* que indica la probabilidad de que la identificación sea correcta (Matthiesen 2007).

Existen dos estrategias principales en proteómica: la estrategia clásica basada en separación de proteínas en geles bidimensionales y la estrategia *shotgun* (ver figuras 9 y 10). La principal diferencia entre ambas estrategias es si la separación de las mezclas complejas se realiza a nivel de péptidos o proteínas.

En la estrategia clásica se realiza la separación a nivel de proteínas mediante electroforesis bidimensional. Esta técnica permite separar cientos de proteínas en base a su pI y masa molecular, las cuales son luego escindidas del gel y digeridas previo a su identificación por espectrometría de masa. En este caso se obtienen huellas peptídicas de cada proteína (MS), así como espectros de fragmentación (MS/MS) de algunos péptidos seleccionados (Wilkins et al 1996).

En el caso de la estrategia *shotgun* la digestión trípica se realiza sin un paso previo de separación de proteínas. De esta manera se obtiene una mezcla compleja de péptidos provenientes de distintas proteínas, los que son luego separados mediante cromatografía líquida y analizados por espectrometría de masa (ver figura 9) (Wolters et al 2001). Generalmente los péptidos se separan mediante cromatografía en fase reversa para lo cual se acopla directamente el sistema de HPLC a un espectrómetro de masa con fuente de ionización de tipo electrospray (ES), que es capaz de adquirir en forma dependiente de los datos. En una primera etapa se obtienen espectros de MS de los péptidos que van eluyendo de la columna y, en función de este resultado, en una segunda etapa el equipo desencadena la fragmentación (MS/MS) de los principales iones detectados. Una vez finalizado este ciclo, que ocurre en tiempos muy cortos del orden de unos pocos segundos, se vuelve a disparar una secuencia de MS y MS/MS (ver figura 9). De esta manera, a lo largo de una corrida cromatográfica de 1 h se obtienen miles de espectros que son comparados con bases de datos para asignar la secuencia de los péptidos y la identidad de las proteínas que los generaron (Matthiesen 2007).

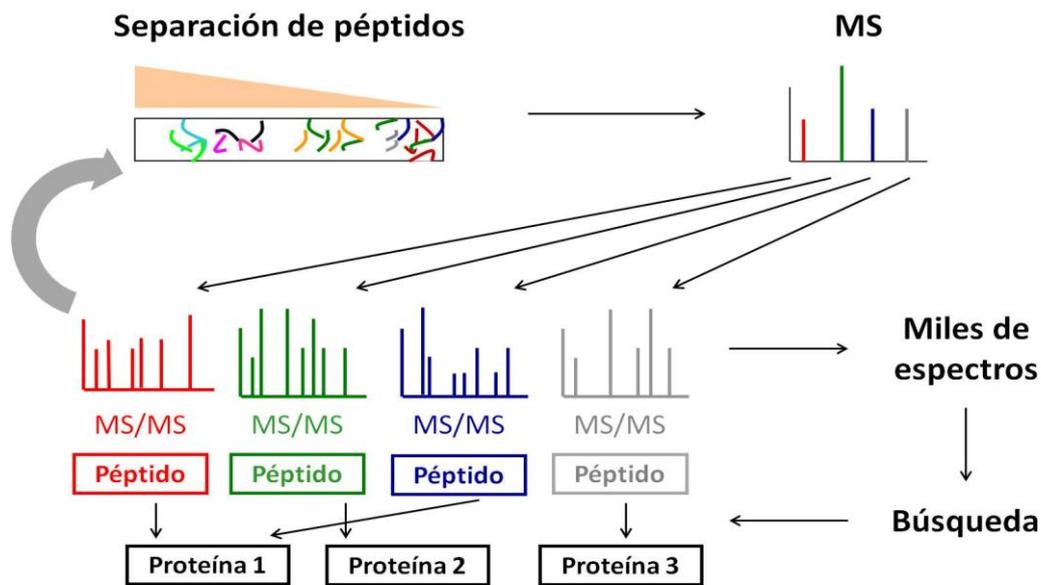


Figura 9. Esquema de trabajo para la estrategia proteómica de tipo *shotgun*

Si bien estas aproximaciones permiten la identificación de un gran número de proteínas a partir de mezclas complejas, una desventaja es que no es posible obtener datos cuantitativos en forma directa. Esto se debe a que las señales que se obtienen en un espectro de masa no son un indicador de la cantidad de péptido o proteína, ya que la volatilización e ionización de péptidos depende de varios factores, incluyendo la propia secuencia y la presencia de otras moléculas que generen supresión iónica (Annesley 2003).

Sin embargo, en los últimos tiempos se han desarrollado distintas estrategias que permiten realizar estudios proteómicos comparativos y cuantitativos basados en espectrometría de masa.

3.b-Proteómica cuantitativa

Las herramientas de proteómica cuantitativa y comparativa permiten comparar los perfiles de expresión proteica entre distintas condiciones biológicas y por tanto asociar diferencias fenotípicas a patrones de expresión diferenciales. A continuación se describen las dos estrategias utilizadas en este trabajo para obtener datos proteómicos cuantitativos: 2D-DIGE y conteo de espectros.

I-2D-DIGE

La metodología de 2D DIGE, permite comparar distintas condiciones biológicas en forma cuantitativa. Brevemente, se marcan las proteínas de dos condiciones a comparar con dos fluoróforos distintos (Cy3 y Cy5), se mezclan y se separan en un mismo gel 2D junto con un estándar interno marcado con un tercer fluoróforo (Cy2). El estándar interno consiste en una mezcla de las proteínas provenientes de todas las réplicas biológicas del experimento y permite comparar la abundancia relativa de cada spot en un mismo gel, así como la comparación inter-geles. Los geles se analizan con un scanner de fluorescencia y su software asociado, lo que permite detectar en forma independiente cada fluoróforo utilizado y determinar diferencias en la abundancia relativa de proteínas en forma precisa (ver figura 10). Los tres fluoróforos utilizados reaccionan con lisinas y poseen aproximadamente la misma masa molecular (450 Da). Además poseen una carga +1 que reemplaza la carga de la lisina, con lo cual el punto isoeléctrico de las proteínas no se ve afectado por el marcaje (Cramer & Westermeier 2012). De esta manera se asegura que la migración en geles bidimensionales de la misma proteína marcada con distintos fluoróforos no se vea afectada.

Las imágenes adquiridas utilizando 4 réplicas biológicas de cada condición a comparar son analizadas con un software específico que permite detectar diferencias estadísticamente significativas en los distintos *spots* en diversas condiciones.

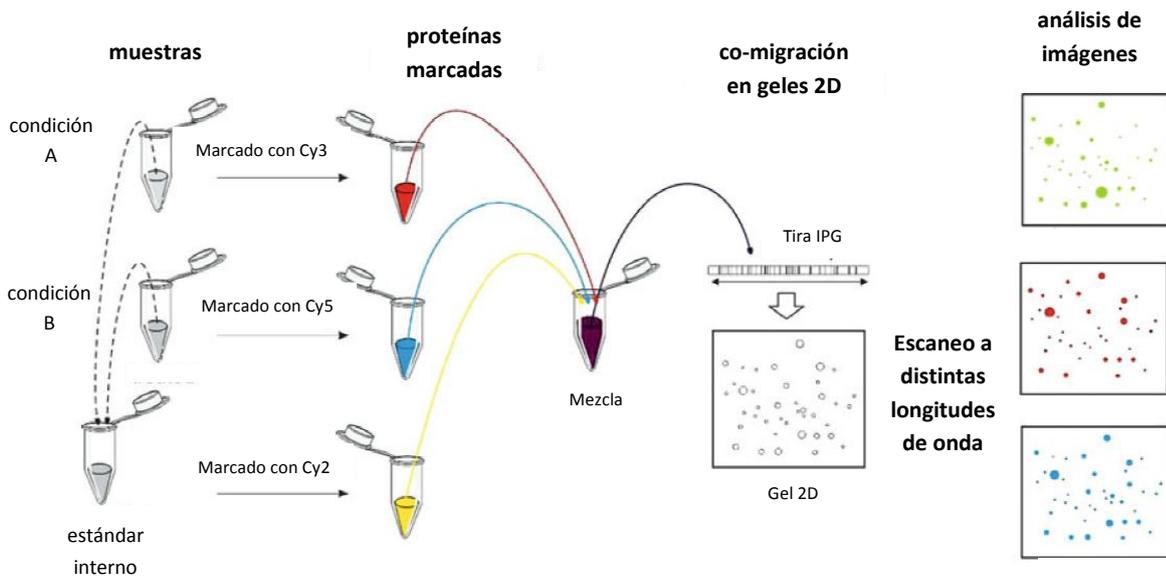


Figura 10. Esquema de trabajo para la estrategia de 2D-DIGE. Adaptado de Cramer & Westermeier 2012.

II-Conteo de espectros

Una estrategia ampliamente utilizada para analizar los datos generados a través de aproximaciones de tipo *shotgun* en forma cuantitativa consiste en comparar el conteo de los espectros de fragmentación asignados a cada proteína en las distintas condiciones a evaluar (Lundgren et al 2010).

El conteo de espectros se basa en la premisa de que cuanto más representada está una proteína en un muestra mayor será el número de espectros de fragmentación adquiridos que se asignen a péptidos de su secuencia. La comparación del número de espectros asignados a una misma proteína en dos condiciones diferentes permite entonces realizar cuantificaciones relativas en los niveles de esta proteína (Bantscheff et al 2007, Liu et al 2004).

III-Objetivos

1.a-Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo es contribuir a dilucidar las bases moleculares de la regulación por di-GMPc de la adhesión de *P. aeruginosa* a superficies bióticas y formación de biofilms. Para ello nos hemos centrado en la fosfodiesterasa PA2133 que se ha visto previamente involucrada en dichos fenómenos.

1.b-Objetivos específicos

1. Generar y caracterizar fenotípicamente una cepa de *P. aeruginosa* que sobreexpresa la fosfodiesterasa de di-GMPc, PA2133 (cepa PDE⁺).
2. Realizar un análisis proteómico comparativo y cuantitativo de las cepas salvaje (WT) y PDE⁺ mediante dos estrategias complementarias: 2D-DIGE y *shotgun* con conteo de espectros. Este análisis se centró en las dos fracciones subcelulares que se encuentran expuestas al contacto con las superficies bióticas y abióticas: proteínas de membrana y exoproteínas.
3. Validar a nivel funcional los cambios encontrados a nivel del proteoma de la cepa PDE⁺.

IV-MATERIALES Y MÉTODOS

1-Cepas, plásmidos y condiciones de crecimiento

Este trabajo se llevó a cabo utilizando la cepa K de *Pseudomonas aeruginosa* (PAK) o derivados de la misma, las cuales fueron crecidas hasta fase de crecimiento estacionario ($DO_{600}=5$) en medio Luria Bertani (LB) o caldo T (triptona 1%) a 37 °C y con 220 rpm de agitación. Las bacterias se almacenaron a -80 en glicerol 20% (v/v) y se mantuvieron para su uso cotidiano en placas de Luria Bertani agar (LBA). Se adicionó gentamicina (200 µg/mL) y/o carbenicilina (250 µg/mL) al medio cuando fue necesario.

El plásmido pJN2133, codificante para el gen *PA2133* bajo el promotor titulable de L-arabinosa fue proporcionado por la Dra. C. S. Hardwood (Hickman et al 2005).

La expresión de la proteína PA2133 se indujo mediante adición de L-arabinosa al medio de cultivo a distintas concentraciones (0,05 y 0,2% (m/v)). Como controles negativos de pili tipo IV y flagelo se utilizaron las cepas Δ PilA (cedida por S. Lory) y Δ FliC (cedida por J. Engel) respectivamente. En estudios de microscopía de fluorescencia, se utilizaron cepas portadoras de un plásmido que contiene GFP (Bucior et al 2010).

2-Generación de la cepa PDE⁺.

Para la extracción del plásmido pJN2133 producido en *E. coli* DH 5 α se utilizó el kit *Gene Elute Plasmid Miniprep* (Sigma). Células competentes de *P. aeruginosa* fueron obtenidas mediante inoculación de una colonia en 2 mL de LB e incubación durante 12 h con agitación a 43 °C. Posteriormente se realizó una dilución 1/20 del cultivo y se incubó en LB a 37 °C con agitación hasta alcanzar una DO_{600} de 0,5. En este punto el cultivo fue puesto en hielo y se recuperaron las bacterias por centrifugación a 6000 x g durante 6 min. El *pellet* fue resuspendido suavemente en 5 mL de 0,1 M MgCl₂ frío y se recuperaron las células nuevamente por centrifugación. Se repitió el lavado con 0,1 M MgCl₂ y el *pellet* fue resuspendido en 2,5 mL de 0,15 M MgCl₂ frío. Se mantuvo en hielo durante 20-30 min, las células fueron recuperadas por centrifugación, resuspendidas en 1 mL de 0,15 M MgCl₂ /glicerol 15% y se almacenadas a -80 °C hasta su transformación.

La transformación de *P. aeruginosa* con plásmido pJN2133 se llevó a cabo mediante incubación en hielo de 200 ng de plásmido purificado con 100 µL de bacterias competentes durante 30 min. Transcurrido este tiempo se realizó un shock térmico por 2 min a 42 °C, el cultivo fue puesto en hielo inmediatamente por 5 min y se sembraron

100 µL en LB agar con gentamicina. Se crecieron algunas colonias durante 12 h en LB con gentamicina (200 µg/mL), a 37 °C con agitación. Estos cultivos fueron utilizados para generar el stock que se almacenó a -80 °C.

3-Cultivos celulares

Células Madin-Darby canine kidney (MDCK, ATCC) fueron cultivadas a 37 °C y con 5% de CO₂ en *Minimal Essential Medium* (MEM, Sigma) suplementado con 5% de suero fetal bovino. Se sembraron 1×10^6 células por pocillo (placas de cultivo de 6 pocillos) o 4×10^5 por dispositivo de tipo *transwell* (12 mm de diámetro, tamaño de poro 0,4 µm, Corning Fisher). Las células fueron utilizadas 48 h post-sembrado.

4-Ensayos de adhesión estándar

Los ensayos de adhesión se llevaron a cabo siguiendo protocolos previamente reportados (Kazmierczak et al 2001). Brevemente, células MDCK fueron infectadas con *P. aeruginosa* durante 30 min a una multiplicidad de infección (MOI, *multiplicity of infection*, número de bacterias por cada célula epitelial) de 30. Las células fueron lavadas con PBS para remover las bacterias no adheridas y la lisis de las células MDCK se llevó a cabo durante 30 min en 0,2 % Tritón X100 en PBS. El contenido de bacterias adheridas se determinó mediante siembra en placas de LBA de diluciones seriadas del lisado celular y posterior recuento de unidades formadoras de colonias (UFCs). Para el análisis se consideraron las placas que contenían entre 30 y 300 UFCs. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y representan el promedio de 5 experimentos independientes. Los resultados se expresan como porcentaje de adhesión respecto a la cepa WT.

5-Evaluación de la formación de exopolisacárido

Se sembraron diluciones seriadas de cultivos estacionarios en placas de caldo T sin sales, suplementado con 40 µg/mL de rojo Congo, 15 µg/mL de azul de Coomassie brillante R-250 y 1% de agar. Las placas se incubaron 72 h a 37 °C y la producción de EPS se evaluó mediante inspección visual de la coloración de las colonias.

6-Ensayo de formación de biopelícula

Se inoculó una colonia en 2 mL de caldo T sin sales y se incubó en forma estática a temperatura ambiente. Luego de 72 h se removieron los cultivos cuidadosamente y se

lavó el tubo 2 veces con agua. Las películas fueron teñidas con Cristal violeta 0,1% en etanol 50% durante 15 min y el colorante en exceso se removió mediante lavados con agua. La biopelícula se visualiza como un anillo violeta adherido al vidrio en la zona que antes fuera la interfase medio/aire.

7-Ensayo de formación de biofilms

Se realizó una dilución 10^{-4} de cultivos de fase estacionaria en caldo T sin sales y se incubaron 100 μ L de la misma en placas de 96 pocillos durante 48 h a temperatura ambiente. Luego de remover el cultivo los biofilms se lavaron con agua para quitar las bacterias no adheridas y se tiñeron con 0.1% cristal violeta durante 15 min. Se lavó nuevamente con agua hasta remover el exceso de tinción. La cuantificación se realizó por destinción del biofilm en ácido acético 30% y medida de absorbancia a 570 nm. Las muestras se evaluaron por triplicado en al menos 7 pocillos independientes.

8-Determinación de niveles endógenos de di-GMPc

Con el fin de comparar los niveles de di GMPc endógeno en las cepas WT y PDE⁺ se realizaron extracciones según el protocolo desarrollado por Simm y colaboradores (Simm et al 2009). La extracción se llevó a cabo como se detalla a continuación. Se centrifugaron 2mL de cultivo bacteriano durante 15 min a 5000 x g. El *pellet* se resuspendió en 300 μ L de ácido fórmico 0,2% frío y se incubó durante 10 min a 4 °C. Se centrifugó nuevamente, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 300 μ L de agua miliQ. Para la extracción de nucleótidos la suspensión fue calentada a 95 °C durante 10 min y se agregaron 700 μ L de etanol 99%. Se centrifugó y se repitió la extracción sobre el *pellet* obtenido. Los sobrenadantes conteniendo los nucleótidos se combinaron y concentraron en un SpeedVac hasta sequedad. El concentrado fue resuspendido en 200 μ L de H₂O miliQ, se filtró a través de un filtro de tamaño de poro 0,2 μ m y se inyectó en HPLC. El análisis por HPLC se llevó a cabo en un equipo Agilent 1200 con una columna Hypersyl Gold aQ (150 mm x 4,6 mm, tamaño de poro 3 μ m, Thermo) operando a un flujo de 1 mL/min. Como fase A se utilizó 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) en H₂O y como fase B 0,1% TFA en metanol. La elución se realizó mediante un primer paso isocrático a 1% B durante 2 min y luego un gradiente de 0 a 20% de B en 20 min. Se registraron las absorbancias a 254 nm y 280 nm. La concentración de di-GMPc en las muestras se determinó mediante interpolación en una curva de calibración. Para generar la curva de calibración se inyectaron por duplicado

0,90; 0,45; 0,22; 0,11 y 0,06 nmoles de estándar de di-GMPc (Kerafast) y se graficó el área de los picos en función de los nmoles de estándar inyectados.

9-Ensayos de movilidad

Las movilidades dependientes de pili tipo IV (*twitching*) y flagelo (*swimming*) se evaluaron en placas de LB suplementadas con 1% y 0,3% de agar respectivamente (O'Toole & Kolter 1998b, Whitchurch et al 1991). Como controles negativos de movilidad se utilizaron las cepas Δ PilA y Δ FliC. En los ensayos de *twitching* se inoculó una colonia a través del agar (con lo que se permite a las bacterias colonizar la interfase agar-plástico) y se incubó 72 h a 37 °C. Los halos de avance fueron visualizados por tinción con azul de Coomassie brillante R-250 en 6:4:1 agua:metanol:ácido acético. Para los ensayos de *swimming* se inoculó una colonia apenas por debajo de la superficie del agar y se creció durante 24 h a 37 °C. Los halos generados se visualizan sin necesidad de tinción.

Las imágenes de las placas se obtuvieron en un equipo G Box (Syngene) con un tiempo de exposición de 400 ms. El área de los halos se determinó utilizando ImageJ J 1.48s (Wayne Rasband, National Institutes of Health EEUU). La calibración se realizó en base al diámetro de las placas (10 cm). Este ensayo se realizó por triplicado para cada experimento, y los resultados son el promedio de tres experimentos independientes.

10-Extracciones de pili tipo IV y flagelo

La extracción de pili tipo IV se realizó siguiendo protocolos previamente reportados (Mattick et al 1987). Brevemente, se sembraron 100 μ L de cultivo en fase de crecimiento estacionario en placas de LB agar, las bacterias se removieron de la superficie del agar utilizando un rastrillo 24 h después y se resuspendieron en 2,5 mL de PBS. Se agitaron las muestras en un *vortex* a velocidad máxima durante 7 min y se centrifugaron a 4 °C y 16000 x g durante 20 min. El sobrenadante de esta centrifugación se incubó 12 h a 4 °C con 1M MgCl₂ para precipitar proteínas. Se repitió la última centrifugación y el pellet conteniendo los pili fue resuspendido en 150 μ L de PBS. Se separó la muestra en geles de poliacrilamida al 16% y las bandas mayoritarias se recortaron para su análisis por espectrometría de masa de tipo MALDI/TOF-TOF (AbSciex 4800 Analyzer, Framingham)

La extracción de flagelos se realizó a partir de 200 mL de cultivo como se describió

previamente en la literatura (Totten & Lory 1990). Los cultivos de *P. aeruginosa* se centrifugaron 15 min a 5000 x g. El *pellet* conteniendo las bacterias se lavó en PBS, se resuspendió en este mismo buffer y se licuó durante 1 min a 4 °C en una licuadora comercial. Este lisado se centrifugó 15 min a 16000 x g y se recuperó el sobrenadante. El sobrenadante se centrifugó a 40000 x g durante 3 h y el *pellet* conteniendo los flagelos fue resuspendido en 150 µL de PBS. Se separó la muestra en geles de poliacrilamida de 12% y las bandas mayoritarias se recortaron para su análisis mediante MALDI/TOF-TOF (AbSciex 4800 Analyzer, Framingham).

11-Microscopía y adquisición de imágenes

Las muestras para microscopía de fluorescencia se obtuvieron a partir de monocapas polarizadas de células MDCK preincubadas en MEM sin suero durante 1 h e infectadas durante 30 min con PAK WT- GFP o PDE⁺- GFP a una MOI de 60. Se lavó con PBS 1X para remover las bacterias no adheridas y se fijó el preparado en 4% paraformaldehído por 30 min a temperatura ambiente. La permeabilización fue realizada con 0,01% tritón X100 a 37 °C y se tiñó con faloidina conjugada a Alexa 594 (Invitrogen). La adquisición de imágenes se realizó en un microscopio confocal de barrido LASER espectral Leica TCS-SP5 (Mannheim, Alemania) equipado con un objetivo HCX PL APO 63/1.4–0.60 CS de inmersión en aceite. Para el canal de faloidina se utilizó λ excitación=594 nm/ λ emisión=600-620 nm y para GFP λ excitación=488 nm/ λ emisión=495-520 nm.

Para microscopía electrónica de transmisión se cargaron 2 µL de cultivo en fase de crecimiento estacionaria sobre grillas de carbón/formvar, se incubó durante 2 min, y se realizó tinción negativa en 2% de acetato de uranilo (Moyes et al 2009). Las imágenes fueron adquiridas en el servicio de Microscopía electrónica de transmisión de Facultad de Ciencias (UdelaR) con un microscopio Jeol (JEM 10-10) operando a 100 V.

Para microscopía de campo claro se utilizó un microscopio Nikon Eclipse E200 con un lente E Plan 10/0.25 WD 7.0.

12-SDS-PAGE

La electroforesis monodimensional se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 12% bajo corriente constante de 10 uA/20 uA para los geles de apilado/separación respectivamente. Las muestras conteniendo buffer de muestra 1X (0.25M Tris, 8% SDS, 40% glicerol, 0.04% azul de bromofenol, 1% β mercaptoetanol) fueron calentadas

durante 8 min a 95 °C previo a la electroforesis. Los geles se fijaron en 4:1:5 etanol:ácido acético:H₂O y se tiñeron con azul de Coomassie G-250 (Baker) en etanol. Las imágenes de los geles fueron adquiridas utilizando un scanner UMAX Power-Look 1120 y el software LabScan 5.0 (GE Healthcare).

13-Western blot

Los geles de SDS PAGE utilizados en western blot se prepararon como se explicó en la sección anterior. La transferencia a membranas de PVDF de baja fluorescencia (GE Healthcare) se llevó a cabo en un equipo de transferencia TE22 MiniTank (GE Healthcare) a 8 °C y 250 mA durante 1 h 45 min. Las membranas se bloquearon durante 12 h a 8 °C en 5% BSA 0,1% Tween 20 en PBS. La incubación con el anticuerpo primario (dil. 1/20000) IgG Conejo-anti FliC (cedido por W. Wozniak) se llevó a cabo en 1% BSA 0,1% Tween 20 en PBS durante 1 h a temperatura ambiente, con agitación. Se incubó con el anticuerpo secundario de cabra anti IgG de conejo acoplado a Cy3 (GE Healthcare) en idénticas condiciones. Las membranas se revelaron en un equipo TyphoonTM FLA 9500 (ver sección DIGE).

14-Obtención de fracciones subcelulares y optimización del protocolo de extracción de proteínas de membrana.

Cultivos de *P. aeruginosa* crecidos hasta fase estacionaria se centrifugaron durante 15 min a 6000 x g y 4 °C. Las exoproteínas se obtuvieron del sobrenadante y las proteínas de membrana se obtuvieron del *pellet*. Los sobrenadantes se filtraron a través de filtros de tamaño de poro 0,2 µm y se concentraron y desalaron utilizando dispositivos para ultrafiltración por centrifugado (Centricon, Millipore) de umbral de corte=10 kDa, de acuerdo a instrucciones del fabricante.

Para la generación de los extractos de membrana se evaluaron 4 protocolos adaptados de la literatura (Thein et al 2010) (tabla 1). En todos los casos se partió de la misma densidad óptica y volumen de cultivo, y el producto de lisis celular se resuspendió en volúmenes iguales para los distintos métodos.

Tabla 1: Esquema de los protocolos utilizados para la obtención de fracciones de proteínas de membrana.

Protocolo	1	2	3	4
Método de lisis	Osmótica		Sonicación suave	Sonicación fuerte
Aislamiento de proteínas	1-Solubilización de proteínas de membrana en detergente 2-Ultracentrifugación 3- Incubación con Na ₂ CO ₃ 4-Ultracentrifugación	1- Solubilización de proteínas de membrana en detergente 2-Ultracentrifugación	1-Incubación con Na ₂ CO ₃ 2-Ultracentrifugación	

Protocolos 1 y 2: Los *pellets* se lavaron en PBS, se resuspendieron en 0.2 M Tris-HCl pH 8, 1 M sacarosa y 1 mM EDTA. Se trataron con 1 mg/mL de lisozima y se agregó H₂O para lisar las bacterias por shock osmótico. Las membranas se solubilizaron en buffer conteniendo 40 mM Tris-HCl (Sigma) pH 8.2, 4% CHAPS (m/v, Sigma) 10 mM MgCl₂ (Sigma), DNAsa 20 µg/mL (Sigma) y RNAsa 10 µg/mL (Sigma). Se centrifugó a 120.000 x g en una ultracentrífuga Beckmman Coulter optima XPN-90 durante 30 min a 4 °C. Para el protocolo 1 los *pellets* conteniendo las proteínas de membrana se resuspendieron en 0,1 M Na₂CO₃ frío y se incubó con agitación durante 1 h a 4 °C. Se centrifugó 1 h a 120.000 x g y se lavó el *pellet* una vez con 0,1 M Tris-HCl pH 7,4 y tres veces con H₂O miliQ. Finalmente la muestra fue resuspendida en buffer compatible con 2D (7 M urea (Sigma) 2 M tiourea (Sigma) 4% CHAPS (Sigma), 1% Amidofosforotribometilato (ASB, Sigma), 40 mM Ditiotretol (DTT Sigma) y 1 X inhibidor de proteasas libre de EDTA, (Roche). El protocolo 2 se distingue del 1 en que carece del paso de resuspensión en Na₂CO₃ (Sigma). Este paso demostró ser fundamental para aumentar el enriquecimiento de la fracción en proteínas de membrana ya que el Na₂CO₃ actúa aboliendo interacciones electrostáticas que mantienen proteínas asociadas unidas a proteínas integrales de membrana o a lípidos presentes en dicha fracción (Fujiki et al 1982).

Protocolos 3 y 4: En estos protocolos la ruptura de las bacterias se realizó por sonicación en un sonicador digital (Branson) y los mismos difieren entre sí en los ciclos de ruptura e intensidad aplicados. Se utilizó 0,1 M Tris-HCl pH 7,3 suplementado con DNAsa y RNAsa (Sigma) como buffer de lisis. Brevemente en el método 3 se utilizó el siguiente protocolo de sonicación: pulsos de 2 min, 10 s *on* y 10 s *off*. Primer, segundo y tercer pulso a 25%, 30% y 30% de amplitud respectivamente, seguido de dos pulsos de

30%, dos de 40%, dos de 50% y 3 de 60%. El protocolo de sonicación del método 4 consistió en 2 pulsos de 8 min, 10 s *on* y 10 s *off* a 20% de amplitud. En ambos casos se centrifugó 15 min a 4 °C y 6000 x g con el fin de remover células enteras y se adicionó inhibidor de proteasas. Los pasos posteriores son idénticos al protocolo 1 a partir de la resuspensión en Na₂CO₃ en adelante.

En todos los casos la cuantificación de proteínas se llevó a cabo por densitometría de geles SDS PAGE, utilizando *Low molecular weight calibration kit* (Amersham). Este kit tiene la ventaja de poseer una cantidad conocida de proteína para cada una de las bandas que lo componen, con lo que permite calibrar la escala de grises en cada gel.

En base a los resultados obtenidos se seleccionó al protocolo 1 para la preparación de las muestras para los análisis proteómicos.

15-2D PAGE y 2D DIGE (*Difference Gel Electrophoresis*)

Se prepararon cuatro muestras independientes de exoproteínas y proteínas de membrana para las cepas WT y PDE⁺ como se describió previamente. Las mismas se purificaron y concentraron utilizando *2-D Clean-Up kit* (GE Healthcare) y se resuspendieron en 10 µL de buffer de marcado para 2D DIGE (7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris pH 8.5) o en buffer de rehidratación para los geles 2D convencionales (7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 40 mM DTT, 0.5% IPG buffer pH 4–7 para proteínas de membrana 0.5% IPG buffer pH 3-10 para exoproteínas).

En el caso de los geles de DIGE, para poder llevar a cabo la comparación inter e intra gel se preparó un estándar interno consistente en una mezcla de 25 µg de proteína de cada condición experimental. El marcado mínimo se realizó utilizando fluoróforos comerciales (Amersham CyDye DIGE Fluors para Ettan DIGE ,GE Healthcare) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se marcaron individualmente 50 µg de proteína de cada condición con 400 pmoles de Cy3 o Cy5. Con el fin de normalizar cualquier diferencia potencial en la eficiencia de marcado, la mitad de las muestras provenientes de una misma cepa se marcaron con Cy3 y las otras con Cy5 (ver tabla 2). El estándar interno se marcó con 1600 pmoles de Cy2. La reacción de marcado se llevó a cabo protegida de la luz durante 30 min en hielo y se detuvo por incubación con 10 mM lisina en hielo y en oscuridad. Se realizó una dilución al medio con buffer 2X DIGE (8 M urea, 4% CHAPS, 130 mM DTT) y los pares de muestras (WT y PDE⁺) se mezclaron con una cantidad igual de estándar interno (llevando la cantidad de proteína para cada gel a 150 µg) de acuerdo a la tabla 2.

Tabla 2: Diseño experimental de los análisis proteómicos por 2D DIGE.

Gel	Cy3	Cy5
1	WT 1	PDE 4
2	WT 2	PDE 1
3	PDE 2	WT 3
4	PDE 3	WT 4

El mismo esquema se utilizó para el análisis de las fracciones de exoproteínas y proteínas de membrana.

Tanto para 2D-PAGE como para 2D-DIGE se llevó el volumen total de muestra a 250 μ L con buffer de rehidratación y las muestras se cargaron por rehidratación pasiva durante 12 h en tiras de isoelectroenfoque de 13 cm (pH 4-7 lineal para proteínas de membrana o pH 3-10 lineal para exoproteínas) utilizando una cuba de rehidratación. El isoelectroenfoque se llevó a cabo en una unidad Ettan IPGphor (Pharmacia), siguiendo los protocolos recomendados por GE para tiras de 13cm. Para exoproteínas se utilizó un gradiente de pH 3-10 y el siguiente perfil de voltaje: fase constante de 500 V 1 h, incremento lineal hasta 1000V 1 h, incremento lineal hasta 8000V 2 h 30 min y una fase final constante a 8000 V hasta alcanzar un total de 3000 Vh. Para proteínas de membrana se usó un gradiente de pH 4-7 y el siguiente perfil de voltaje: fase constante de 500 V 1 h, incremento lineal hasta 1000 V 1 h, incremento lineal hasta 8000 V 2 h 30 min y una fase final constante a 8000 V hasta alcanzar 5400 Vh. Previo a la segunda dimensión, se redujeron los puentes disulfuro y se alquilaron las cisteínas de las proteínas presentes en las tiras. Brevemente las tiras se incubaron 15 min en buffer de equilibración (6 M urea (Sigma), 75 mM Tris-HCl pH 8.8 (Sigma), 29.3% glicerol (Riedel de Hæn), 2% SDS (Sigma), 0.002% azul de bromofenol (Baker)) suplementado con DTT 10 mg/mL como agente reductor y luego se alquilaron durante 15 min en buffer de equilibración suplementado con iodoacetamida (IAA) 25 mg/mL. La segunda dimensión se llevó a cabo en un gel SDS-PAGE (al 12% para exoproteínas o 10% para proteínas de membrana) utilizando una cuba de electroforesis Ruby SE 600 equipada con una unidad de enfriamiento Multitemp III, GE Healthcare termostatzada a 20 °C y una intensidad de corriente de 40 μ A por gel.

Los geles 2D convencionales se fijaron en 4:1:5 etanol:ácido acético:H₂O y se tiñeron con azul de Coomassie G-250 (Baker) en etanol. Las imágenes fueron adquiridas

utilizando un scanner UMAX Power-Look 1120 y el software LabScan 5.0 (GE Healthcare).

En el caso de los geles de DIGE, los mismos se digitalizaron utilizando un escáner de fluorescencia Typhoon™ FLA 9500 (GE Healthcare) equipado con los siguientes filtros de excitación/emisión específicos para cada fluoróforo: 635 nm/*longpass red* 665 nm para Cy5; 532 nm/*bandpass green* 570 nm DF20 para Cy3; 473 nm/*bandpass blue* 530 nm DF20 para Cy2. Las imágenes (16 bits) se obtuvieron a un tamaño de píxel de 100 µm y la ganancia de fotomultiplicador más baja que permitiera una cobertura completa del rango dinámico. El pre-procesamiento de dichas imágenes se realizó con el software ImageQuant TL v8.1 (GE Healthcare) y luego se exportaron al programa DeCyder 7.2 (GE Healthcare) para su análisis. La co-detección de spots, cuantificación por normalización y el cálculo de proporciones fueron llevados a cabo con el módulo *Differential In-gel Analysis* (DIA) del programa DeCyder. El pareamiento de geles y análisis estadístico que permitieron la comparación de los niveles de expresión de proteínas entre múltiples geles fue llevada a cabo con el módulo *Biological Variation Analysis module* (BVA) del programa DeCyder. Para la selección de spots se aplicaron los siguientes criterios: tasa de cambio normalizada $\pm 25\%$, valor $p \leq 0.05$.

16-Identificación de proteínas por MALDI/TOF-TOF

Los *spots* diferenciales fueron manualmente cortados del gel, desteñidos con una solución de 0,1M NH_4HCO_3 en acetonitrilo (ACN) 50% (v/v) y digeridos con tripsina porcina modificada (grado secuenciación, Promega). La extracción de los péptidos se llevó a cabo en 0,1% (v/v) ácido trifluoroacético (TFA) en 60% ACN durante 1 h 2 veces. Se evaporó el ACN utilizando un SpeedVac y las muestras se concentraron y desalaron utilizando micro columnas de fase reversa C18 Zip Tip® (Merck, Millipore) previamente equilibradas con 0,1% TFA. La elución de los péptidos se llevó a cabo con solución de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, CHCA) en 60% ACN 0,1% TFA directamente en una placa Opti-TOF de 384 posiciones (Ab Sciex). La adquisición de los espectros se realizó en un espectrómetro de masa de tipo MALDI-TOF/TOF (4800 Analyzer Abi Sciex) operando en modo reflector positivo. Los espectros fueron calibrados externamente con una mezcla estándar de péptidos (Applied Biosystems). A partir de los espectros obtenidos (MS) se seleccionaron las señales más intensas para la obtención de espectros de fragmentación (MS/MS).

El procesamiento de datos se realizó con el software Data Explorer v4.9. (Applied Biosystems). Para el filtrado de las señales del espectro se utilizó un valor mínimo de relación señal/ruido de 25 para MS y 15 para MS/MS. Las búsquedas se llevaron a cabo con el motor de búsqueda Mascot (<http://www.matrixscience.com>) en el modo *Sequence query*, utilizando la base de datos de proteínas de la cepa PAK que se descargó de UniProt (<http://www.uniprot.org>) o la base de datos del NCBI 20130706. Los parámetros de búsqueda fueron: Taxonomía no restringida; saltos de cortes de tripsina permitidos=1; modificaciones parciales: oxidación de metionina y carbamidometilación de cisteínas; tolerancia de masa de péptidos=0,05 Da y tolerancia MS/MS=0,3 Da. Los valores de m/z utilizados corresponden a los valores monoisotópicos. Se consideró positiva la identificación de proteínas con un *Mascot protein score* estadísticamente significativo ($p < 0.05$) y al menos una fragmentación asignada con un *Mascot peptide ion score* significativo ($p < 0.05$).

17-Análisis proteómico por nano LC-MS/MS

Los extractos a analizar se corrieron en geles de poliacrilamida al 12%, se recortaron los carriles correspondientes y se llevó a cabo la reducción-alquilación de cisteínas *in-gel* como se detalla a continuación: Los carriles recortados se incubaron durante 1 h a 56 °C con DTT 10 mM. Transcurrido este tiempo se dejó a la muestra alcanzar temperatura ambiente, se removió el DTT y se incubó 45 min a temperatura ambiente con una solución 55 mM de IAA. La digestión con tripsina y extracción de los péptidos se llevó a cabo como se detalló en la sección anterior.

Los péptidos extraídos fueron concentrados y desalados en columnas de fase reversa C18 Zip Tip® (Merck, Millipore) previamente equilibradas con 0,1% ácido fórmico (fase A). La elución de los péptidos se realizó con 0,07% de ácido fórmico en 70% ACN (fase B). Las muestras se evaporaron hasta sequedad en *SpeedVac* y se resuspendieron en fase A. La concentración de péptidos se estimó a través de medida de absorbancia en un *NanoDrop* 1000 (Thermo).

La adquisición de los espectros se llevó a cabo en un espectrómetro de masa LTQ Velos (Thermo Scientific) equipado con una trampa iónica lineal y acoplado a un sistema nano-HPLC easy-nLC 1000 (Proxeon-Thermo Scientific). Para la separación de los péptidos se utilizó una pre columna *PepMap C18 nano-trap* Acclaim® 75 μm x 500 mm, (Thermo Scientific) y una columna *PepMap C18 Easy spray* 50 μm x 150 mm

(RSLC, 2 μm , 100 \AA). La elución de los péptidos se llevó a cabo a un flujo de 250 nL/min utilizando un gradiente de 5% a 55% de fase B en 100 min. El análisis *on-line* se realizó en modo dependiente de datos (escaneo completo seguido de MS/MS de los 10 valores m/z más intensos de cada segmento), usando una energía de colisión normalizada de 35. El voltaje de la fuente se fijó en 1,3 kV y la temperatura en 260 °C. Para la selección de los valores de m/z a fragmentar por segmento se utilizó una lista de exclusión dinámica con los siguientes parámetros: recuento de repeticiones=3; duración de la repetición=30 s; duración de la exclusión=45 s. Para la adquisición de datos se utilizó el programa Xcalibur v2,1 (Thermo).

El proteoma de la cepa PAK conteniendo información de 5806 secuencias se descargó de UniProt (<http://www.uniprot.org>). Utilizando el programa *PatternLab for proteomics* v3.2.0.3 (Carvalho et al 2012) (<http://pcarvalho.com/patternlab>) se generó una base de datos *target reverse* que incluye una lista de los 127 contaminantes más comunes. Los datos crudos se utilizaron para interrogar nuestra base de datos utilizando los parámetros que se detallan a continuación: tolerancia de masa del precursor (ppm): 700; enzima: tripsina; especificidad de la enzima: completa; máximo de cortes saltados permitidos: 1 modificaciones variables máximas por péptido: 2; modificaciones variables: oxidación de metioninas; modificaciones fijas: carbamidometilación de cisteínas.

El filtrado de los espectros asignados se realizó con el motor de búsqueda *PatternLab*. Se establecieron como criterios una tasa de falsos positivos (*False discovery rate* FDR) de 3% a nivel de espectros, 2% a nivel de péptidos, 1% a nivel de proteínas y un mínimo de dos secuencias asignadas para cada proteína. Todos los resultados reportados poseen un FDR menor a 1%. El software *PatternLab*, módulo *project organization*, se utilizó para comparar los proteomas WT y de PDE⁺ utilizando el número de espectros adquiridos para cada proteína como indicador de su abundancia. Las proteínas presentes exclusivamente en WT o PDE⁺ se identificaron mediante el módulo *Approximate area-proportional Venn diagram* del mismo programa. En este trabajo, se compararon 4 réplicas por condición (WT y PDE⁺) para proteínas de membrana y 3 réplicas para exoproteínas debido a que para una de las muestras se perdió mucha proteína durante la extracción del gel. Las proteínas de membrana se consideraron como exclusivamente representadas en una clase (WT y PDE⁺) si se encuentran presentes en al menos 3 de 4 réplicas de esa clase pero en 1 o 0 de la otra clase. En el caso de las exoproteínas las proteínas se consideraron como positivas para una clase si fueron detectadas en al menos 2 o 3 réplicas y están ausentes en la otra clase. Aquellas proteínas que se

encuentran presentes en ambas muestras pero en distintos niveles se identificaron por conteo de espectros utilizando el módulo *TC fold*. Se consideraron aquellas proteínas presentes en al menos 3 réplicas por clase para proteínas de membrana y al menos 2 réplicas por clase para exoproteínas (WT o PDE⁺), con un valor de BHq \leq 0,05. Sólo las proteínas que satisfacen los criterios de tasa de cambio y estadístico se consideraron diferencialmente expresadas.

Debido a la falta de información funcional y de localización subcelular para las proteínas de la cepa PAK, se utilizaron las secuencias de cada una de las proteínas identificadas como diferenciales por *shotgun* (194 proteínas de membrana, 164 exoproteínas) para realizar alineamientos contra la base de datos de la cepa de referencia PA01. Para ello se utilizó la herramienta *Blast* de *Pseudomonas database* (Winsor et al 2011).

18-Análisis estadístico de los resultados

El análisis estadístico de los datos generados en los ensayos de adhesión se llevó a cabo mediante test de Student.

Para los ensayo de formación de biofilms, movilidad dependiente de flagelo y movilidad dependiente de pili se realizó un análisis de varianza (ANOVA, $p\leq 0,05$) seguido de test de Tukey ($q\leq 0,05$).

V-RESULTADOS

1. Comparación fenotípica de las cepas PAK PDE⁺ y WT.

La cepa PDE⁺ fue generada a partir de la transformación de la cepa WT con el plásmido pJN2133 como se explicó en materiales y métodos. Las colonias obtenidas de la cepa PDE⁺ tienen la misma morfología que las de la cepa WT. Asimismo, la capacidad de proliferación de ambas cepas en medio líquido es comparable, ya que los cultivos alcanzan simultáneamente la misma DO₆₀₀ (Resultados no mostrados). Inicialmente comparamos los niveles de di-GMPc en ambas cepas y llevamos a cabo una caracterización fenotípica de la cepa PDE⁺ en cuanto a su capacidad de formación de estructuras multicelulares y adhesión a superficies bióticas.

1.1-La cepa PDE⁺ posee bajos niveles de di-GMPc

Con el fin de estudiar el efecto de la sobreexpresión de la proteína PA2133 sobre los niveles endógenos de di-GMPc, se realizaron extracciones de nucleótidos para las cepas WT y PDE⁺ según protocolos reportados en la literatura (ver materiales y métodos). La curva estándar utilizada para determinar el contenido de di-GMPc en éstas muestras se observa en la figura 11 A.

Según este análisis, la concentración de di-GMPc en la cepa WT es de 250 pmoles por cada 100 mg de células (peso húmedo) y para la cepa PDE⁺ suplementada con 0,2% de arabinosa este valor se encuentra por debajo del límite de detección del método de HPLC (14 pmoles por cada 100 mg de bacterias). Los valores de concentración para la cepa WT se encuentran en el mismo orden de magnitud que los reportados previamente en la literatura para la cepa de *P. aeruginosa* WT20265 (100 pmol de di-GMPc por cada 100 mg de células) (Simm et al 2009). La identidad de los picos con el mismo tiempo de retención que el estándar de di-GMPc se determinó mediante espectrometría de masa de tipo MALDI/TOF-TOF. En el espectro de masa obtenido se observa que la señal mayoritaria corresponde a la señal esperada para el ion monocargado del di-GMPc (m/z observado: 691,5; m/z teórico: 691,4) (figura 11 B). La identidad del mismo fue confirmada mediante MS/MS. Los iones observados en el espectro de fragmentación son consistentes con la estructura química de di-GMPc, y su patrón de fragmentación previamente reportado (Simm et al 2004). Las estructuras asignadas a las señales mayoritarias en el espectro de fragmentación se observan en la figura 11 B panel derecho. Por lo tanto, a partir de éstos resultados podemos concluir que la

sobreexpresión de la PDE PA2133 produce una cepa de *P. aeruginosa* con niveles de di-GMPc indetectables en nuestro sistema, y que están por debajo de 14 pmoles por cada 100 mg de bacterias WT (peso húmedo).

A

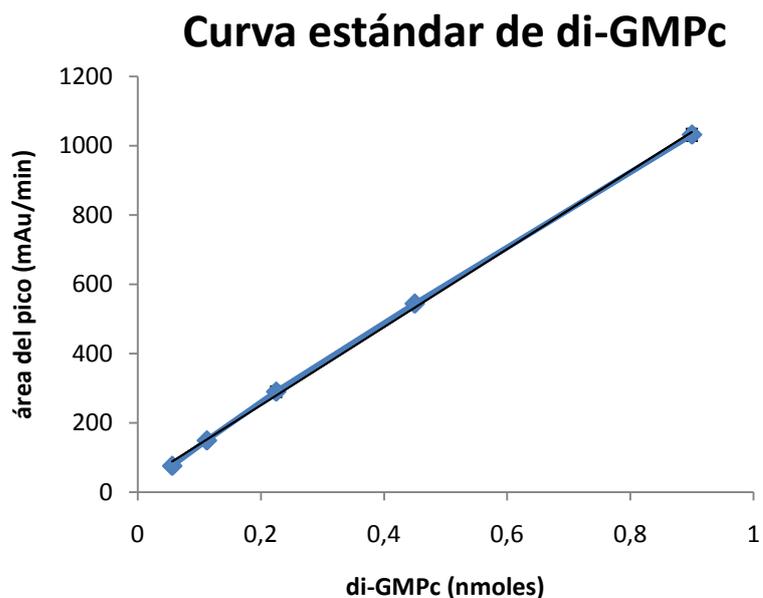


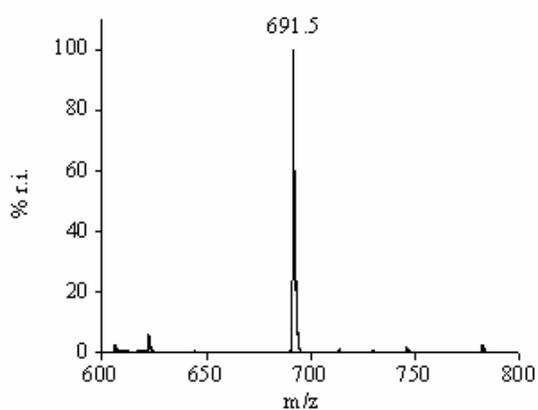
Figura 11. Determinación de la concentración de di-GMPc endógeno por HPLC

A-Curva de calibración generada a partir de la determinación del área de los picos en el cromatograma luego de la inyección de distintas cantidades del estándar de di-GMPc.

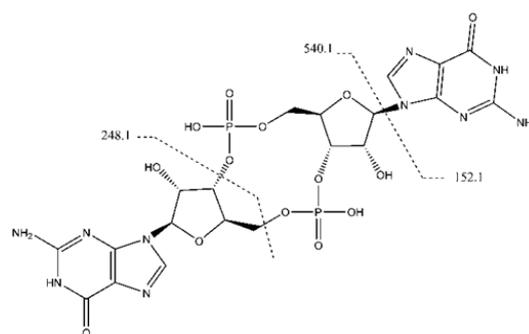
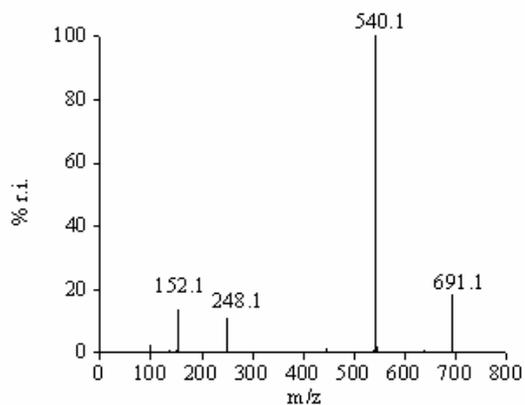
B-Espectro MS del pico correspondiente al tiempo de retención del di-GMPc en muestras obtenidas de la cepa WT.

C-Espectro MS/MS del ion mayoritario en el espectro de masa en B (m/z : 691,5). A la derecha se observa una representación de la molécula de di-GMPc y las estructuras correspondientes a las masas observadas en el espectro de la izquierda.

B



C



1.2-La cepa PDE⁺ tiene disminuida la capacidad de formación biofilms y síntesis de Exopolisacárido.

En la figura 12A se muestran los resultados obtenidos para la formación de biopelículas en tubo de ensayo, visualizadas por tinción con cristal violeta. En la misma se observan claramente los bordes de la película formada por la cepa WT asociados al vidrio, mientras que la sobreexpresión de la proteína PA2133 disminuye marcadamente la capacidad de formar éstas estructuras multicelulares. Más aún, la suplementación del medio con 0,05% y 0,2% de L-arabinosa permitió observar una disminución gradual en la formación de biopelículas. Debido a que el gen *PA2133* se encuentra bajo el promotor de L-arabinosa, y que el mismo es titulable, estos resultados indican que el fenotipo observado se correlaciona con los niveles de expresión de PA2133.

La formación de biofilms se cuantificó mediante ensayos en placa de microtitulación, por determinación de la absorbancia a 570 nm del cristal violeta retenido en los biofilms en al menos 7 pocillos por condición. En la figura 12B se observa que la inducción del gen *PA2133* con 0,05% de L-arabinosa disminuye la formación de biofilms en un 72%, mientras que la inducción con 0,2% la reduce en un 77% respecto a la cepa WT. Mediante test de ANOVA ($p < 0,05$) seguido de test de Tukey ($q < 0,05$), se determinó que estas diferencias son estadísticamente significativas, sugiriendo que el fenotipo observado en la formación de biofilms se correlaciona con los niveles de expresión de la proteína PA2133.

Finalmente se evaluó la producción de EPS creciendo las cepas WT y PDE⁺ en medio suplementado con rojo Congo. Este colorante ha sido ampliamente utilizado como indicador de la capacidad de producción de EPS, ya que el mismo se une a los carbohidratos que conforman la substancia polimérica extracelular. En la figura 12 C se muestra una imagen de las colonias donde se observa que la cepa WT incorpora el colorante mientras que esta incorporación está muy disminuida en la cepa PDE⁺.

En suma, los resultados obtenidos nos permiten concluir que la cepa que sobreexpresa la proteína PA2133 posee un fenotipo defectuoso tanto para la formación de biofilms/biopelículas como para la producción de EPS.

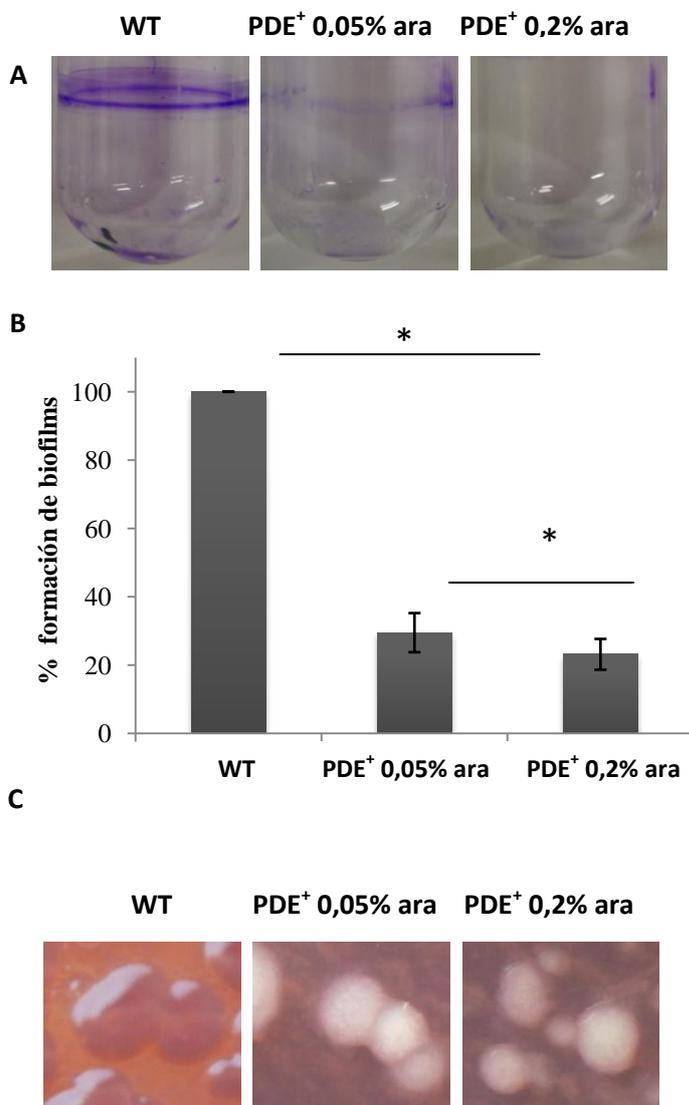


Figura 12. Efecto de la sobreexpresión de PA2133 sobre la formación de biopelículas (A), biofilms (B) y EPS (C) en *P. aeruginosa*.

Todos los ensayos se llevaron a cabo para las cepas WT y PDE⁺ suplementada con 0,05 % de L-arabinosa (0,05% ara) o 0,2% de L-arabinosa (y 0,2% ara).

A-Fotografía de los bordes de las biopelículas adheridos al tubo de ensayo, teñidas con cristal violeta.

B-Cuantificación de la formación de biofilms por ensayo en placa de microtitulación. * indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) por ANOVA y test de Tukey ($q < 0,05$).

C-Apariencia de las colonias crecidas en medio suplementado con rojo Congo.

1.3-La cepa PDE⁺ tiene disminuida la capacidad de adhesión a la superficie epitelial.

Dado que el primer paso para la translocación de toxinas al hospedero es la adhesión a la superficie celular, en el presente trabajo se evaluó la capacidad de adhesión de la cepa PDE⁺ a células epiteliales MDCK. Para ello se realizaron ensayos de microscopía confocal, así como ensayos de adhesión estándar que permitieron cuantificar el efecto observado en la microscopía. En la figura 13A se muestran imágenes representativas de los ensayos de adhesión evaluados mediante microscopía confocal. En rojo se observa el citoesqueleto de actina de las células MDCK teñido con faloidina-alexa 594 y en verde las bacterias (PAK-GFP). A partir de estos experimentos es posible observar que el número de bacterias adheridas a la superficie de las células epiteliales es mucho menor para la cepa PDE⁺ (suplementada con 0,2% L-arabinosa) con respecto a la cepa WT. Esta observación se confirmó mediante la cuantificación de las bacterias adheridas a la superficie epitelial. Brevemente, se sembró el producto de lisis celular en placas de LB agar y se contaron las UFCs. Los datos normalizados indican que la adhesión de la cepa PDE⁺ (0,2% de L-arabinosa) es del 6% con respecto a la cepa WT (Figura 13B). Estos resultados son el promedio de 5 experimentos independientes evaluados por triplicado para cada condición, y las diferencias observadas son estadísticamente significativas (test T de Student, $p < 0.05$). En conjunto, estos resultados demuestran que la capacidad de adhesión a la superficie celular está muy reducida en la cepa PDE⁺.

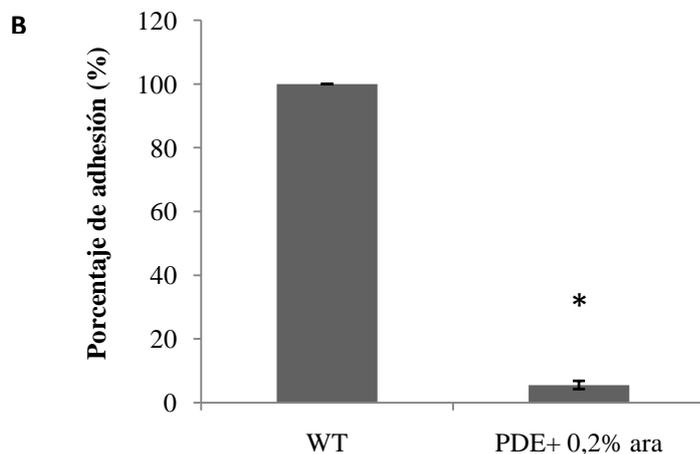
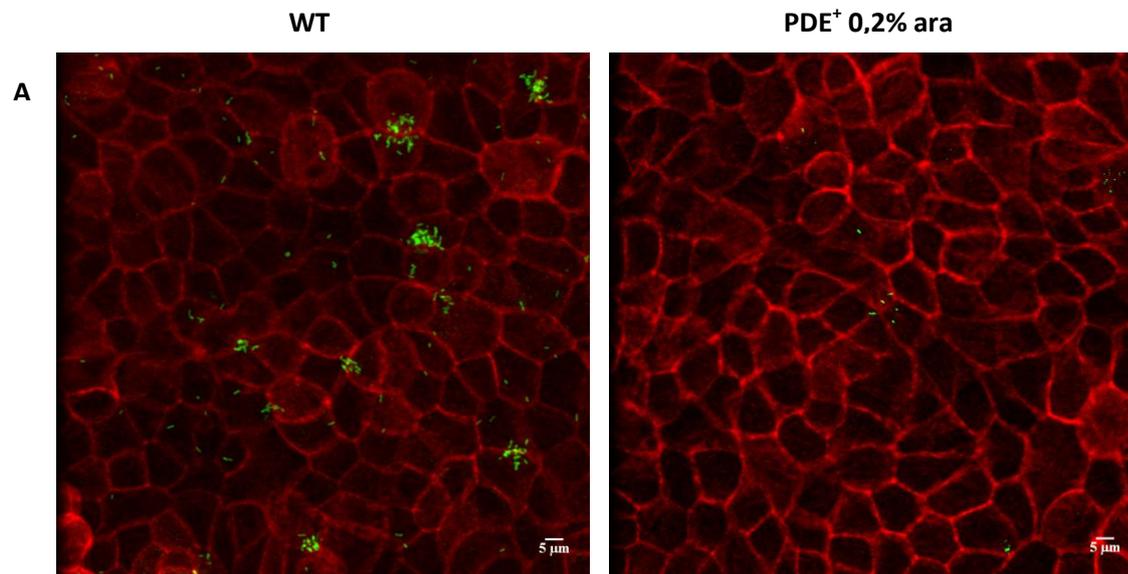


Figura 13. Efecto de la expresión de la fosfodiesterasa de di-GMPc PA2133 sobre la capacidad de adhesión de *P. aeruginosa* a la superficie epitelial.

A-Imágenes de microscopía confocal donde se observan en verde se observan bacterias WT y PDE⁺ expresando GFP y en rojo el citoesqueleto de actina de las células MDCK teñidas con faloidina-alexa 594..

B-Adhesión relativa cuantificada mediante ensayo estándar. Se observa una reducción de la adhesión del 94 % para la cepa PDE⁺ respecto a WT. La diferencia es estadísticamente significativa por test T de Student ($p < 0,05$).

2. Análisis proteómico de las cepas de *P. aeruginosa* PDE⁺ y WT.

Con el fin de profundizar en los mecanismos moleculares responsables de los cambios fenotípicos observados en la cepa PDE⁺ se llevaron a cabo estudios proteómicos cuantitativos y comparativos entre ambas cepas. Para ello se utilizaron dos estrategias proteómicas complementarias: la estrategia clásica basada en geles bidimensionales y la estrategia *shotgun*. El análisis se centró además en el estudio de proteínas presentes en dos fracciones sub-celulares: proteínas de membrana y exoproteínas.

2.1-Proteínas de membrana

a. Optimización de los protocolos de extracción de proteínas de membrana y su separación en geles bidimensionales.

La extracción y análisis de proteínas de membrana representan un desafío desde el punto de vista analítico debido a las dificultades asociadas a su carácter hidrofóbico. Por este motivo, como paso previo al análisis proteómico, se optimizó la extracción y separación de proteínas de membrana. Para esto se evaluaron 4 protocolos: dos de ellos (1 y 2) implican lisis osmótica mientras que en los otros dos (protocolos 3 y 4) la lisis se realizó por sonicación (ver materiales y métodos). Un resumen de cada uno de estos protocolos se muestra en la tabla 1.

Las muestras obtenidas con los distintos protocolos fueron separadas en geles de SDS PAGE como se muestra en la figura 14. En todos los casos se observan patrones muy similares, donde las bandas mayoritarias son comunes a todos los métodos. Por otro lado, utilizando espectrometría de masa se identificaron las proteínas presentes en las distintas bandas (visibles por tinción con azul de Coomassie) para corroborar que corresponden a proteínas de membrana. En la tabla 3 se muestran las proteínas identificadas en cada banda y su localización subcelular de acuerdo a la anotación en la base de datos de *Pseudomonas database* (Winsor et al 2011). Todas las proteínas identificadas utilizando el protocolo número 1 corresponden a proteínas de membrana. En comparación, el protocolo número 2 permitió recuperar bandas adicionales, que fueron luego identificadas como proteínas citosólicas (ver tabla 3). Los protocolos 3 y 4 se distinguen del protocolo 1 en que el método de lisis utilizado es la sonicación. Dado que este método de lisis no mejora la recuperación de proteínas de membrana, y debido a la potencial peligrosidad de los aerosoles generados al sonicar un patógeno oportunista, se eligió el protocolo 1 para los experimentos siguientes.

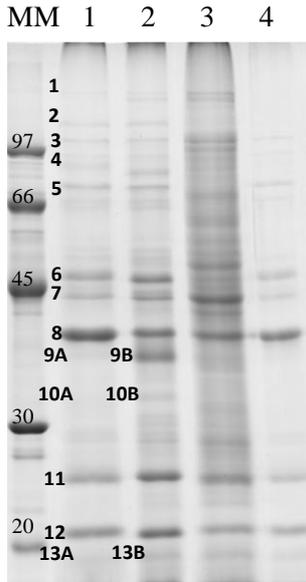


Figura 14. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones de proteínas de membrana obtenidas por los distintos protocolos.

Gel de SDS PAGE teñido con azul de Coomassie mostrando el patrón de proteínas recuperadas por los distintos métodos utilizados para la preparación de fracciones de membrana. Las bandas indicadas en los carriles 1 y 2 se recortaron y analizaron por MALDI-TOF/TOF. Las proteínas identificadas se resumen en la tabla 3.

MM-Marcador de masa molecular;

Carril 1: Protocolo 1 (lisis osmótica/Incubación con Na₂CO₃)

Carril 2: Protocolo 2 (lisis osmótica)

Carril 3: Protocolo 3 (sonicación fuerte)

Carril 4: Protocolo 4 (sonicación suave)

Tabla 3: Proteínas identificadas en las principales bandas obtenidas por separación de la fracción de membrana de la cepa WT de *P. aeruginosa* mediante SDS PAGE

Nº en el gel	Gen en PA01	Proteína identificada	Cobertura de secuencia	<i>Mascot protein score</i> *	Nº de péptidos asignados	Localización †
1	PA3115	FimV	30%	255	13	CM
2	PA0595	OstA	28%	221	23	OM
3	PA5040	PilQ	31%	317	16	OM
4	PA3790	OprC	36%	404	16	OM
5	PA0958	Porin OprD	42%	515	16	OM
6	PA4067	Porin OprG	24%	113	4	OM
7	PA0291	Porin OprE	27%	99	10	OM
8	PA4941	Protease subunit HflC	20%	98	5	OMV
9A 9B	PA1777	Porin OprF	26% 44%	180 370	6 10	OM
10A		No identificada ⁺				
10B	PA4260	50s ribosomal protein	45%	221	12	C
11	PA2853/ PA0973	Porin OprI/ Porin OprL	38%/44%	89/170	4/7	OM/OM
12	PA1178	PhoP/Q and low Mg ²⁺ inducible protein	13%	79	2	OM

13A		No identificada ⁺				
13B	PA3068	Glutamate dehydrogenase	20%	253	27	C

* Todos los Mascot *scores* reportados fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

† Localización de acuerdo a *Pseudomonas database* OM: Membrana externa; CM: Membrana citoplásmica; OMV: Vesículas de membrana externa; C: Citoplásmica

⁺ En estas muestras no se identificó de manera estadísticamente significativa ninguna proteína. Las señales mayoritarias observadas corresponden a tripsina.

Luego de definir el método para la generación del extracto de proteínas de membrana se procedió a optimizar su separación en geles bidimensionales. Para este fin se analizaron extractos de la cepa WT como referencia, utilizando un gradiente de pH 3-10 lineal de 13 cm para la primer dimensión y geles de acrilamida al 12% para la segunda dimensión. El gel generado se muestra en la figura 15, donde se pueden observar spots bien definidos. Los 28 *spots* mayoritarios señalados se recortaron para su identificación (ver tabla 4). Mediante el algoritmo Psort 3.0 se predijo la localización subcelular de todas las proteínas identificadas en base a su secuencia (Yu et al 2010). Según nuestros resultados (Figura 15 B) el 82 % de las proteínas identificadas corresponden a proteínas de membrana (71% membrana externa y 11% interna) mientras que el resto representan proteínas citoplasmáticas (14%) o de localización indeterminada (4 %).

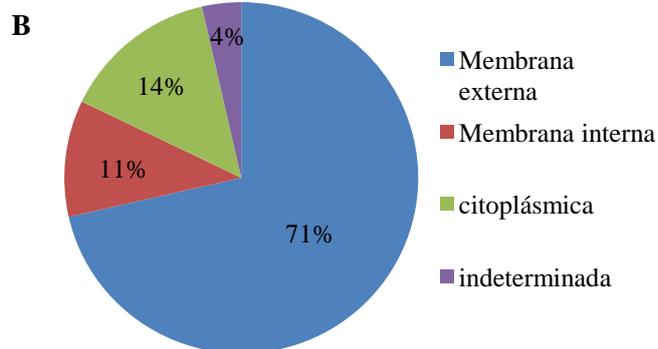
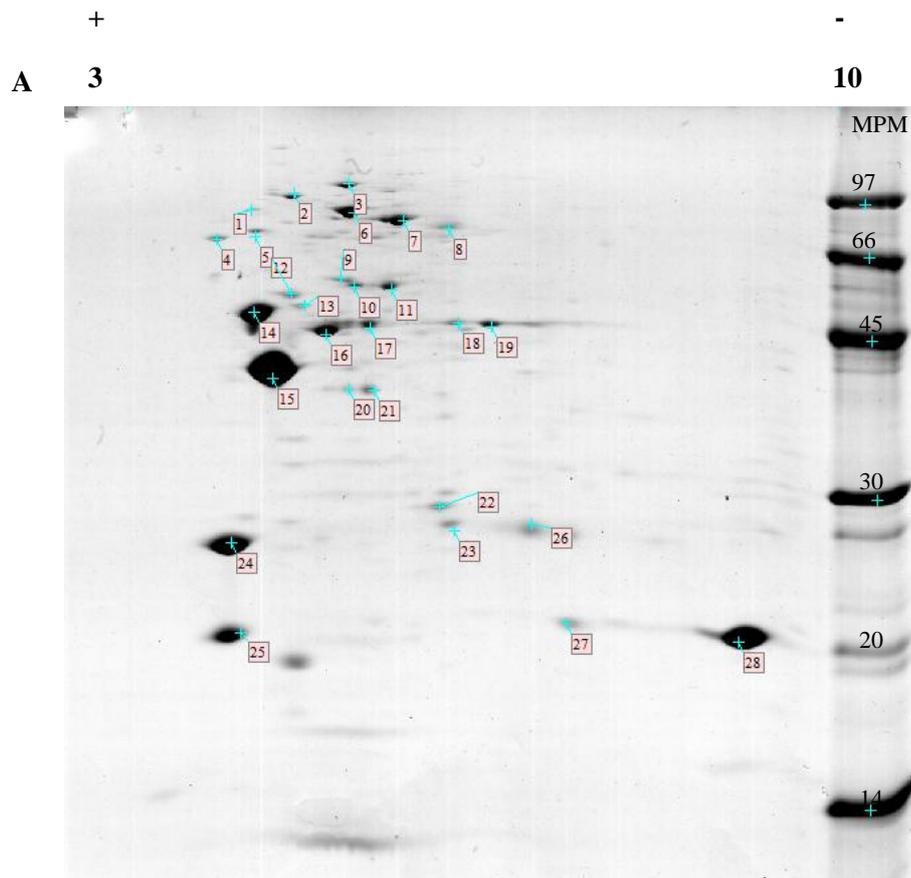


Figura 15. Separación en geles bidimensionales e identificación de proteínas en la fracción enriquecida en proteínas de membrana de la cepa WT.

A-Imagen representativa de la fracción de membrana analizada en geles 2D (13 cm lineal, gradiente de pH 3-10, 12% de acrilamida) teñidos con azul de Coomassie. A la derecha se observa el marcador de masa molecular. Los 28 spots mayoritarios indicados en la figura fueron identificados por espectrometría de masa y búsqueda en bases de datos. La lista de proteínas identificadas se muestra en la tabla 4. Como se observa en la imagen la mayoría de los spots se acumulan en la zona de pH ácido y alta masa molecular.

B-Predicción de la localización subcelular de las proteínas identificadas a partir del gel 2D mediante el algoritmo PSort. Se observa que el 71% de las proteínas identificadas corresponden a proteínas de membrana externa, 11% a membrana interna, 14% a proteínas citoplásmica y 4% poseen localización indeterminada.

Tabla 4: Proteínas identificadas en los spots obtenidos por separación de la fracción de membrana de la cepa WT en geles 2D.

N° en el gel	Gen en PA01	Proteína identificada	Cobertura de secuencia	Mascot protein score*	N° de péptidos asignados	Localización †
1	PA0328	PapB	26%	200	15	OM
2	PA3648	Opr86	15%	268	10	OM
3	PA0595	OstA	26%	256	22	OM
4	PA5112	EstA	12%	98	6	OM
5	PA3923	Hypothetical protein	22%	91	10	OM
6	PA5040	PilQ	47%	577	28	OM
7	PA3790	OprC	30%	341	14	OM
8	PA1583	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	29%	240	15	CM
9	PA5556	ATP synthase FOF1 subunit alpha	16%	246	7	C
10	PA4974	TolC	54%	456	19	OM
11	PA4501	OpdP	33%	286	10	OM
12	PA5554	ATP synthase FOF1 subunit beta	50%	292	18	CM
13	PA3186	OprB	35%	167	8	OM
14	PA0958	OprD	21%	270	9	OM
15	PA1777	OprF	63%	374	17	OM
16	PA2760	OprE3	38%	456	16	OM
17	PA1288	Omp	35%	269	10	OM
18	PA0291	OprE	21%	167	8	OM
19	PA0291	OprE	31%	350	12	OM
20	PA4352	Universal stress protein	30%	177	8	C
21	PA3349	Chemotaxis protein	37%	179	8	C
22	PA1584	Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	39%	157	9	CM
23	PA4431	Iron-sulfur protein	41%	231	6	CM
24	PA4067	OprG	47%	171	11	OM
25	PA1556	Cbb3-type cytochrome C oxidase subunit II	28%	127	8	C
26	PA4067	OprG	51%	236	12	OM
27	PA4661	PagI	70%	212	9	I
28	PA1178	Pho P/Q	53%	307	8	OM

* Todos los Mascot scores reportados fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

† La localización celular se predijo utilizando el programa Psort. OM: Membrana externa. CM: Membrana citoplásmica. I: Indeterminada. C: citoplásmica

Dado que la mayoría de las proteínas se concentran en la zona de pH ácido, y que las mismas se acumulan en la parte superior del gel, para fines posteriores el análisis se llevó a cabo en gradientes de pH 4-7 y geles de poliacrilamida al 10%. Geles representativos para las cepas PDE⁺ (0,2% L-Arabinosa) y WT se muestran en la figura 16. Como se puede observar los perfiles de proteínas están muy conservados entre ambas cepas indicando que los cambios fenotípicos no se deben a un cambio global en la expresión de proteínas mayoritarias de membrana, sino que se relacionan con cambios en los niveles de expresión de proteínas menos abundantes o a cambios en la actividad de las proteínas.

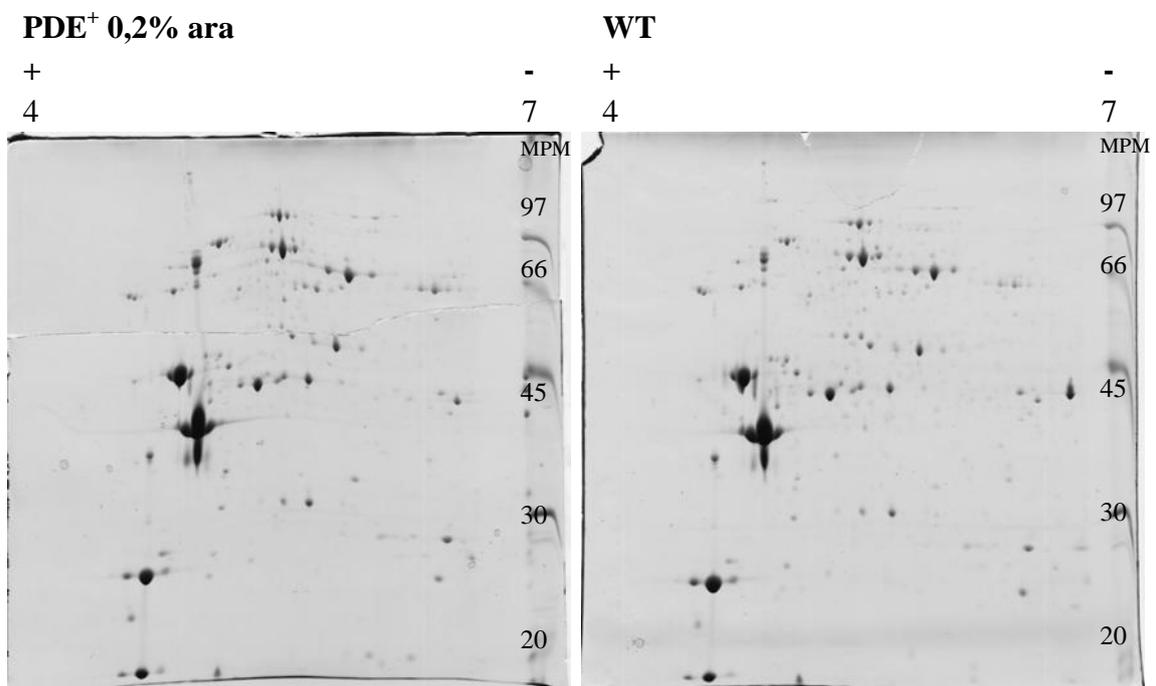


Figura 16. Separación de proteínas de membrana de las cepas WT y PDE⁺ por electroforesis bidimensional.

Imágenes representativas de la fracción de membrana. Primera dimensión: gradiente de pH 4-7. Segunda dimensión: separación en geles 10% de acrilamida. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie.

b. Análisis comparativo de la sub-fracción de proteínas de membrana insoluble en buffer 2D.

Durante la preparación de extractos de membrana para su separación en geles bidimensionales, se observó que una fracción de las proteínas permanece insoluble al momento de resuspender las mismas en buffer de rehidratación 2D. Esta subfracción de proteínas (que corresponde aproximadamente a un 5% del total de la fracción de membrana) fue resuspendida en buffer 1D y analizada por SDS PAGE (ver materiales y métodos). El análisis de estas subfracciones permitió detectar algunas proteínas diferenciales entre las cepas WT y PDE⁺, que se indican en la figura 17. Estas diferencias observadas fueron consistentes en 4 extractos preparados en forma independiente. Las bandas indicadas se recortaron del gel y se analizaron mediante espectrometría de masa de tipo MALDI-TOF/TOF. La tabla 5 resume las proteínas identificadas en cada banda con sus respectivos porcentajes de cobertura de secuencia, número de péptidos asignados, *scores* de Mascot y localización subcelular. La banda 4 que presenta una mayor intensidad en la cepa PDE⁺, se identificó como la proteína PA2133, confirmando la sobreexpresión de nuestra fosfodiesterasa de interés. Los resultados se muestran en la figura 18, donde se observa el espectro de masa obtenido (Figura 18 A) y la asignación de los valores experimentales de *m/z* a péptidos de la secuencia de PA2133 (Figura 18 B). Este resultado no solo permitió confirmar la sobreexpresión de la fosfodiesterasa PA2133, sino también obtener datos que confirman parcialmente su secuencia (cobertura 75%).

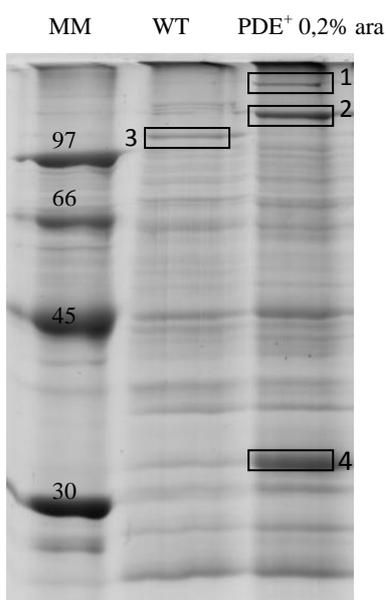


Figura 17. Análisis por SDS-PSGE (12% acrilamida) de la subfracción de membrana insoluble en buffer 2D.

Las proteínas presentes en la fracción insoluble de las cepas WT y PDE⁺ fueron separadas por SDS PAGE. Las bandas indicadas con un recuadro fueron cortadas para su análisis por espectrometría de masa. La identidad de las proteínas se resume en la tabla 5. A la izquierda se observa el marcador de masa molecular.

Tabla 5: Proteínas identificadas en las bandas diferenciales presentes en la fracción de membrana insoluble en buffer 2D de las cepas WT y PDE⁺

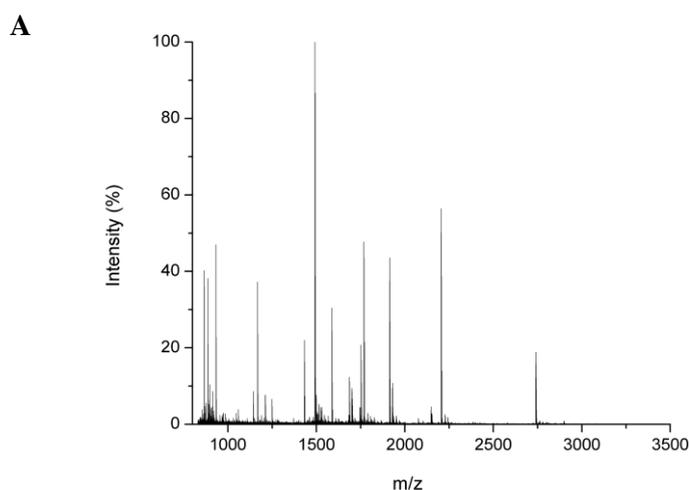
N° en el gel	Gen en PAK	Gen en PA01 ^a	Proteína identificada ^b	Cobertura de secuencia	Mascot protein score*	N° de péptidos asignados	Localización †	Sobre-representado en:
1	PAK_00629	PA0413	ChpA	21%	349	46	C	PDE ⁺
2	PAK_02078	PA3115	FimV	40%	517	30	MI	PDE ⁺
3	PAK_02078	PA3115	FimV	34%	459	29	MI	WT
4	PAK_03199	PA2133	Fosfodiesterasa de di-GMPc	75%	298	20	MI	PDE ⁺

^a Las búsquedas fueron realizadas utilizando una base de datos de la cepa PAK. Se realizó una comparación de secuencias (*Pseudomonas database blast*) para identificar el gen en la cepa PA01.

^b La anotación de la proteína se obtiene de la búsqueda en base de datos de la cepa PAK y en caso de no existir, de su homólogo en PA01

* Todos los Mascot scores reportados fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

† La localización subcelular se determinó de acuerdo a la base de datos *Pseudomonas database*. MI: Membrana interna; C: citoplásmica



B

```

1  MNSSPQARQH EHPVAASL AGDLRLARRF QAALARGRVR LDWQAVRHAG
51  HPEWEPLYRE TLLRVTAAAG EPPLPTQELI LALERLGLVC LLDRCVLGTV
101 LDRLNAEPTL RLACNLSRQS AAMDAAWEAV CRWLAARPQV ARRLTLELTE
151 TAVGERVATR EFIRRLREHG VRIAIDDFGA AHNNLDFVLD ARPDVIKIDC
201 RYTREARRSA KGAEVLRHLL ALCRELAPCV VLEGLEEDDA FARLPTGDVY
251 LQGNAIAPPM RVEPPLSVRR PKSRARIEAL ASRQG
    
```

Figura 18. Análisis por espectrometría de masa de tipo MALDI/TOF-TOF de la banda 4 de la figura 17.

A- Espectro de masa de los péptidos tripticos obtenidos a partir de la banda 4.

B- Asignación de los valores de m/z a péptidos de la secuencia de PA2133 utilizando el motor de búsqueda Mascot. Los péptidos identificados se indican en rojo en la secuencia (cobertura de secuencia: 75%)

Por otro lado, las bandas 2 en PDE⁺ y 3 en WT fueron identificadas inequívocamente como FimV (PA3115). En particular, se observó que la isoforma predominante en WT posee menor masa molecular que la forma predominante en PDE⁺. Experimentos

posteriores demostraron que los niveles globales de esta proteína son comparables en ambas cepas. Para analizar en mayor detalle las diferencias en secuencia de las formas de mayor y menor masa molecular de FimV, se analizaron los péptidos obtenidos por digestión trípica de las bandas predominantes en cada cepa mediante espectrometría de masa de tipo ESI-trampa iónica acoplado a nano HPLC. Esta aproximación permitió aumentar la cobertura de secuencia obtenida. En el caso de la cepa PDE⁺ se identificaron péptidos a lo largo de toda la secuencia de FimV, obteniendo un 63% de cobertura de secuencia. Sin embargo, en el caso de la cepa WT sólo se obtuvo un 41% de cobertura de secuencia. Notablemente en este último caso se identifican péptidos correspondientes a la región N-terminal de la proteína, pero no así a la región C-terminal que contiene el dominio TPR (Wehbi et al 2011). Estos resultados indican que mientras que este dominio está presente en la isoforma mayoritaria de la cepa PDE⁺, no se detectan péptidos del mismo en la isoforma de menor masa molecular mayoritaria en la cepa WT (Figura 19).

WT

1	MVRLRTLVR	IAAASVLTSG	MAHGLGLGEI	TLKSALNQPL	DAEIELLEVR
51	DLGSGEVIPS	LASPEEFASKA	GVDRLYLTD	LKFTPVVKPN	GKSVIRVTSS
101	KPVQEPYLN	LVQVLWPNGR	LLREYTVLLD	PPLYSPQAAA	SAPQAPVSAP
151	RATGAPRAPQ	APAPVRTTAP	AGSDTYRTVS	NDTLWEIAQR	NRTDRVSVVQ
201	AMLAFQELNP	GAFVDGNINR	LKSGQVLRIP	TEQQMLERSP	REALSQVQAQ
251	NQSWRGSRN	AAGSAGARQL	DATQRNAAGS	APSKVDATDN	LRLVSGEGKA
301	SKGADKGGK	DSKAIADTLA	VTKESLDSTR	RENEELQSRM	QDLQSQLDKL
351	OKLIQLKDAQ	LAKLQGGQGA	EGQGAAQPNA	ALPDASQPNA	AAQAPAPQPGT
401	PAAAAPTAP	AGEAPAAPAQ	PPVAPPAPPA	AEKPPAPAVP	APAPVQAEEQ
451	PAPSFLEDEL	ANPLWLAVIG	GSALLALLVL	LMILSRNAQ	KEKEEAQAF
501	ADTGEEQEDA	LDLGKDGFD	LTLDEPEPQV	AAVAPQVEKT	TAQTSDALGE
551	ADIYIAYGRF	NQAAELLQNA	IYDEPQRTDL	RLKLMVEYAE	MGDRREGFARQ
601	ENELREIGGA	QPQVEQLKSR	YPAMVAVAAV	AGLAGAKLAQ	DELDSFSLDD
651	LSLDDSGHAA	KPDAAGQDLD	DAFDLSLDDL	GGGDVQADLK	SDSGALDDLT
701	LDSLDLDAAS	TAADKPVDL	DFGLDFAELA	ETPSQPKHDD	LGDFSLDLDA
751	PEDKLSDDDF	LLSLNDEVPA	AAPADNEFTL	DTEAAEPPAL	SLPDDFDLSL
801	ADEPTEPAAP	EKGEDSFAAQ	LDEVSAQLDE	LASNLDPEPKS	ATPSFSAEDA
851	AVASALDGA	DDDFDLGSA	DEAATKLDLA	RAYIDMGDSE	GARDILDEVL
901	AEGNDSQQAE	ARELLERLA			

PDE⁺ 0,2% ara

1	MVRLRTLVR	IAAASVLTSG	MAHGLGLGEI	TLKSALNQPL	DAEIELLEVR
51	DLGSGEVIPS	LASPEEFASKA	GVDRLYLTD	LKFTPVVKPN	GKSVIRVTSS
101	KPVQEPYLN	LVQVLWPNGR	LLREYTVLLD	PPLYSPQAAA	SAPQAPVSAP
151	RATGAPRAPQ	APAPVRTTAP	AGSDTYRTVS	NDTLWEIAQR	NRTDRVSVVQ
201	AMLAFQELNP	GAFVDGNINR	LKSGQVLRIP	TEQQMLERSP	REALSQVQAQ
251	NQSWRGSRN	AAGSAGARQL	DATQRNAAGS	APSKVDATDN	LRLVSGEGKA
301	SKGADKGGK	DSKALADTLA	VTKESLDSTR	RENEELQSRM	QDLQSQLDKL
351	OKLIQLKDAQ	LAKLQGGQGA	EGQGAAQPNA	ALPDASQPNA	AAQAPAPQPGT
401	PAAAAPTAP	AGEAPAAPAQ	PPVAPPAPPA	AEKPPAPAVP	APAPVQAEEQ
451	PAPSFLEDEL	ANPLWLAVIG	GSALLALLVL	LMILSRNAQ	KEKEEAQAF
501	ADTGEEQEDA	LDLGKDGFD	LTLDEPEPQV	AAVAPQVEKT	TAQTSDALGE
551	ADIYIAYGRF	NQAAELLQNA	IYDEPQRTDL	RLKLMVEYAE	MGDRREGFARQ
601	ENELREIGGA	QPQVEQLKSR	YPAMVAVAAV	AGLAGAKLAQ	DELDSFSLDD
651	LSLDDSGHAA	KPDAAGQDLD	DAFDLSLDDL	GGGDVQADLK	SDSGALDDLT
701	LDSLDLDAAS	TAADKPVDL	DFGLDFAELA	ETPSQPKHDD	LGDFSLDLDA
751	PEDKLSDDDF	LLSLNDEVPA	AAPADNEFTL	DTEAAEPPAL	SLPDDFDLSL
801	ADEPTEPAAP	EKGEDSFAAQ	LDEVSAQLDE	LASNLDPEPKS	ATPSFSAEDA
851	AVASALDGA	DDDFDLGSA	DEAATKLDLA	RAYIDMGDSE	GARDILDEVL
901	AEGNDSQQAE	ARELLERLA			

Figura 19. Cobertura de secuencia de las isoformas de la proteína FimV de alta y baja masa molecular.

Asignación de los espectros de fragmentación obtenidos usando una trampa iónica a secuencias de FimV. Las secuencias identificadas en cada caso se indican en rojo. Cobertura de secuencia obtenida para WT: 41%; para PDE⁺ 0,2% arabinosa: 63%

Por último, la banda 1 fue identificada como ChpA (PA0413). A partir de nuestros resultados no es posible concluir si la detección de esta proteína en la fracción de membrana de la cepa PDE⁺ se debe a un aumento global en su expresión o a un cambio de localización por un mecanismo aun desconocido.

c. Análisis proteómico comparativo de proteínas de membrana por 2D DIGE

Para este análisis se utilizaron 4 extractos independientes para cada condición. La concentración de proteínas determinada por densitometría para cada extracto se resume en la tabla 6. El diseño experimental del 2D DIGE se resume en la tabla 2, y los detalles de la adquisición y análisis de imágenes se describen en materiales y métodos. Una imagen representativa de un gel de 2D-DIGE se muestra en la figura 20.

Tabla 6: Concentración de proteínas en la fracción de membrana determinada por densitometría de geles de SDS PAGE.

Extracto	[Proteínas] ($\mu\text{g/mL}$)
WT 1	2,01
WT 2	1,44
WT 3	2,37
WT 4	2,23
PDE ⁺ 1	1,42
PDE ⁺ 2	1,55
PDE ⁺ 3	2,26
PDE ⁺ 4	2,09

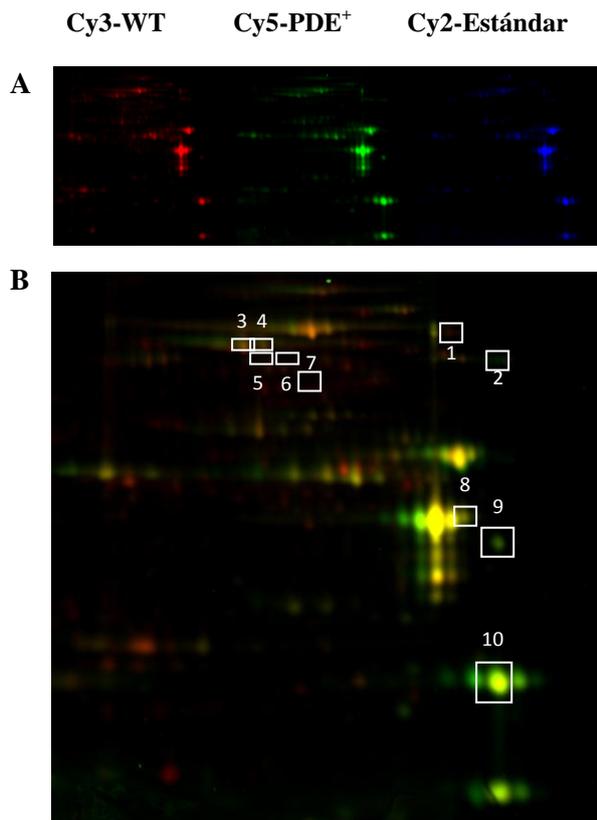


Figura 20. Análisis por geles 2D-DIGE de la fracción de proteínas de membrana.

A-Imágenes representativas de un gel 2D de gradiente de pH 4-7 y 10% de acrilamida.

Se muestra la detección diferencial de las proteínas provenientes de las distintas condiciones: rojo: WT (Cy3); verde: PDE⁺ 0,2% ara (Cy5); azul: Estándar interno (Cy2).

B-Imágenes superpuestas de Cy3 y Cy5. El análisis de imágenes de los 4 geles del experimento permitió detectar 569 *spots*, de los cuales 41 *spots* fueron diferenciales considerando una tasa mínima de cambio de $\pm 1,25$ y $p < 0,05$. Los 10 *spots* indicados en el gel se cortaron para su análisis por espectrometría de masa. En la tabla 7 se muestran las proteínas identificadas en cada *spot*, así como los niveles relativos de cada *spot* en las distintas cepas.

El análisis de imágenes de los cuatro geles permitió detectar 569 *spots*, de los cuales 41 fueron diferenciales considerando una tasa de cambio mínima de $\pm 1,25$ y un $p < 0,05$; 23 de ellos se detectaron sobrerrepresentados en WT y 18 en PDE⁺. La tasa de cambio máxima observada para estos *spots* fue de 4,79 (*spot 6*) mientras que el menor cambio correspondió al *spot 2* con una tasa de 1.48. Del total de 41 *spots* diferenciales solamente 10 tuvieron una intensidad suficiente para ser escindidos manualmente de un gel preparativo teñido con Coomassie. La identidad de las proteínas contenidas en dichos *spots* se obtuvo mediante análisis por espectrometría de masa de tipo MALDI/TOF-TOF. En la tabla 7 se muestra la lista de las proteínas identificadas incluyendo para cada caso los datos de cobertura de secuencia, *Mascot score*, número de péptidos asignados, valor p, tasa de cambio y localización subcelular. En los 10 *spots* recortados se identificaron 11 proteínas. Solamente una de ellas (CdrB) está sobrerrepresentada en PDE⁺, mientras 3 *spots* sobrerrepresentados en WT contienen 4 proteínas (OprD, *Type A flagellin*, EstA y PA0328). CdrB junto con CdrA forman parte de un sistema de dos componentes donde CdrA es una adhesina secretada que une carbohidratos y CdrB es su transportador. OprD es una porina que se ha visto implicada en la translocación de aminoácidos básicos y péptidos a través de la membrana así como

en la resistencia a algunos antibióticos (Peng et al 2005, Trias & Nikaido 1990). La flagelina tipo A es la principal subunidad estructural del flagelo y cumple un rol fundamental en la movilidad y adhesión, además de ser un conocido factor de virulencia (Brimer & Montie 1998, Feldman et al 1998). EstA es una esterasa de membrana que se ha visto implicada en la producción del biodetergente ramnolípido, así como en la movilidad celular y formación de biofilms (Wilhelm et al 2007). La función de PA0328 es desconocida. En el caso del *spot 8* se identificaron dos proteínas (OprD y *Type A flagellin*), por tanto a partir de este análisis no es posible concluir cuál de las dos es responsable de la variación en la intensidad relativa de fluorescencia detectada. Para los 6 *spots* restantes, las diferencias se adjudicaron fundamentalmente a la presencia de diferentes isoformas de la misma proteína en WT y PDE⁺. En particular el *spot* correspondiente a OprG (masa molecular 25 kDa) posee mayor intensidad de fluorescencia relativa en la cepa WT, mientras que otra isoforma de la misma proteína (masa molecular 35 kDa) fue detectada con mayor intensidad en la cepa PDE⁺. OprG es una porina que se ha visto implicada en la resistencia a antibióticos y se cree que está relacionada a la captación de hierro del medio (Gensberg et al 1999, Peng et al 2005). Una situación similar, pero con cambio en el punto isoeléctrico (pI) ocurre en el caso de los *spots* de *ABC transporter* y OprC. *ABC transporter* es una proteína de función poco descrita y OprC es una porina regulada por Cu²⁺ y se cree que participa en la captación de este ion del medio (Yoneyama & Nakae 1996). Para *ABC transporter*, la isoforma predominante en WT posee un punto isoeléctrico de 5,5 mientras que en la isoforma predominante en PDE⁺ el pI es de 5,6. Para OprC la isoforma mayoritaria en WT tiene un pI de 5,5 y para la mayoritaria en PDE⁺ el pI es de 5,4. En estos casos las diferencias observadas en el pI probablemente se deban a modificaciones postraduccionales, fundamentalmente aquellas que adicionan o suprimen una carga en la proteína, como la fosforilación o la acetilación. Sin embargo a partir de la comparación de los mapas peptídicos de las diferentes isoformas de estas proteínas no fue posible identificar péptidos diferenciales que pudiesen ser responsables de los cambios en pI observados. Tampoco se encontraron descritas en la bibliografía modificaciones postraduccionales para estas proteínas.

Tabla 7: Identidad de las proteínas presentes en los *spots* diferenciales de las fracciones de membrana analizadas por 2D DIGE.

Nº en el gel	Gen en PAK	Gen en PA01	Proteína identificada ^a	Cobertura de secuencia	Mascot <i>protein score</i> *	Nº de péptidos asignados	<i>p-value</i>	Tasa de cambio	Sobre-representada en
1	PAK_00540	PA0328	Putative aminopeptidase	25%	209	10	0,0035	2,96	WT
2	PAK_05618	PA5112	Esterase (EstA)	24%	183	9	0,0039	1,48	WT
3	PAK_01389	PA3790	TonB dependent receptor (OprC)	59%	357	36	0,0063	2,94	PDE ⁺
4	PAK_01389	PA3790	TonB dependent receptor (OprC)	62%	396	38	0,065	2,57	WT
5	PAK_05062	PA4595	ABC transporter ATP binding protein	25%	226	9	0,0009	2,84	WT
6	PAK_05062	PA4595	ABC transporter ATP binding protein	36%	211	14	0,0130	4,79	PDE ⁺
7	PAK_05093	PA4624	Hemolysin activation/secretion protein (CdrB)	51%	327	20	0,0078	2,23	PDE ⁺
8	PAK_04422/ PAK_04280	PA0958 ausente	Porin (OprD) Type A flagellin	48% 38%	286 148	16 10	0,014	2,77	WT
9	PAK_01111	PA4067	Membrane protein (OprG)	37%	135	12	0,018	2,34	PDE ⁺
10	PAK_01111	PA4067	Membrane protein (OprG)	26%	126	4	0,015	2,68	WT

^a La anotación de la proteína se obtiene de la búsqueda en base de datos de la cepa PAK y en caso de no existir de su homólogo en PA01.

* Todos los Mascot *scores* reportados fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

d. Análisis proteómico cuantitativo de proteínas de membrana por LC MS/MS.

Los mismos extractos generados para el análisis por 2D-DIGE (4 WT y 4 PDE⁺) fueron analizados mediante cromatografía líquida utilizando un nano-HPLC acoplado a un espectrómetro de masa de tipo ESI-trampa iónica. Los espectros de MS y MS/MS obtenidos fueron analizados con el programa *PatternLab*. Las proteínas presentes en cada una de las réplicas biológicas analizadas de las cepas WT o PDE⁺ se identificaron por comparación con una base de datos de la cepa PAK. En el caso de las muestras de la cepa WT se identificaron 442, 331, 482 y 429 proteínas utilizando el criterio de máxima parsimonia, con un mínimo de 2 secuencias peptídicas identificadas. Estas proteínas

representan el mínimo de proteínas que justifican las secuencias identificadas a partir del apareamiento de espectros. Por otro lado en el caso de las réplicas de las muestras PDE⁺ se identificaron 324, 418, 193 y 540 proteínas utilizando el mismo criterio estadístico. Utilizando el programa PatternLab (módulo *Approximate area-proportional Venn diagram*) se realizó un análisis de las proteínas presentes exclusivamente en una u otra cepa. Se tomó como criterio considerar como exclusivamente representadas en una clase a aquellas proteínas que están presentes en al menos 3 de 4 réplicas de una condición y en 1 o 0 de la otra. El análisis muestra que 190 proteínas están presentes en ambas condiciones, 114 proteínas están presentes solamente en WT, y que 57 proteínas están presentes exclusivamente en PDE⁺. Las proteínas que se identificaron exclusivamente en WT se muestran en la tabla 8, mientras que la tabla 9 muestra las proteínas presentes únicamente en PDE⁺. En las tablas se muestra además el número de réplicas en las que se identificó cada proteína y su señal total (que representa la sumatoria de los espectros asignados a esa proteína en las distintas réplicas). Debido a la escasez de información sobre localización subcelular y función de las proteínas de la cepa PAK, se utilizó la herramienta *Blast* sobre la base de datos de PA01 de la *Pseudomonas database* (Winsor et al 2011). De esta forma se determinó el gen homólogo en PA01 de cada proteína identificada, así como el porcentaje de homología. Esto permitió obtener información acerca de la función de cada proteína (*PseudoCAP function*) así como de su localización subcelular.

Las proteínas más abundantes (y para las cuales no se encontraron diferencias entre ambas cepas) se detectaron con un gran número de espectros (señal total entre 3600 y 400). Estos datos están en concordancia con lo observado en los geles 2D, donde los perfiles de las proteínas más abundantes no están modificados por la sobreexpresión de PA2133.

Tabla 8. Proteínas identificadas exclusivamente en la fracción de membrana de la cepa WT en análisis proteómicos de tipo *shotgun*.

Gen en PAK	Gen en PA01 ^a	% de homología	Proteína identificada ^b	N° de réplicas	Señal total ^c	Localización [†]	<i>PseudoCAP function</i>
PAK_05103	PA4633	100	Chemotaxis protein	4	109	CM	Adaptation, Protection-Chemotaxis
PAK_02646	PA2654	100	Chemotaxis protein	4	107	CM	Adaptation, Protection-Chemotaxis
PAK_00915	PA4256	100	50S ribosomal protein L16 (RplP)	4	90	C	Translation, post-translational modification, degradation
PAK_01276	PA3901	99,7	Fe(III) dicitrate transporter (FecA)	4	86	OM/OMV	Membrane proteins-Transport of small molecules
PAK_03742	PA1608	99,6	Chemotaxis protein	4	84	CM/OM	Adaptation, Protection-Chemotaxis
PAK_02331	PA2867	99,6	Chemotaxis transducer	4	84	CM	Adaptation, Protection-Chemotaxis
PAK_04765	PA4309	100	Chemotaxis protein (Fragment) (PctA)	4	77	CM	Adaptation, Protection-Chemotaxis
PAK_02492	PA2788	99,8	Chemotaxis protein	4	73	CM/OM	Adaptation, Protection-Chemotaxis
PAK_05178	PA4689	99,7	Paraquat-inducible protein B-like protein	4	68	OM/OMV	Hypothetical, unclassified, unknown
Y880_01135_80	PA5253	99,7	Transcriptional regulator (AlgR)	4	66	U/OMV	Transcriptional regulators
PAK_02114	PA3082	100	Glycine betaine transmethylase	4	64	OM/OMV	Amino acid biosynthesis and metabolism
PAK_03220	PA2113	99,3	Porin (OpdO)	4	64	OM	Transport of small molecules-Membrane proteins
PAK_04762	PA4307	99,8	Chemotaxis protein (Fragment) (PctC)	4	62	CM	Adaptation, Protection-Chemotaxis
PAK_00379	PA0162	99,3	Outer membrane porin (OpdC)	4	61	OM/OMV	Membrane proteins-Transport of small molecules
PAK_02648	PA2652	99,8	Chemotaxis protein	4	58	CM	Adaptation, Protection-Chemotaxis
Y880_01255_65	PA0328	99,2	Membrane protein (AaaA)	4	54	OM/OMV	Hypothetical, unclassified, unknown-Amino acid biosynthesis and metabolism
PAK_05262	PA4765	99,4	Outer membrane protein assembly factor (BamE)	3	50	OM/OMV	Membrane proteins-Transport of small molecules
PAK_02745	PA2651	96,8	Chemotaxis protein (CtpH)	4	48	CM	Adaptation, Protection-Chemotaxis
PAK_04302	PA1080	99,8	Flagellar hook protein (FlgE)	3	47	E/OMV	Cell wall / LPS / capsule-Motility & Attachment
PAK_02660	PA2641	100	NADH-quinone oxidoreductase subunit F (NuoF)	3	46	C	Energy metabolismo
PAK_03767	PA1584	100	Succinate dehydrogenase (SdhB)	3	46	CM/OMV	Energy metabolismo
PAK_03791	PA1561	99,6	Aerotaxis receptor (Aer)	4	45	CM/OMV	Adaptation, Protection-Chemotaxis
PAK_04034	PA0434	98,8	TonB-dependent	4	45	OM	Membrane proteins

00650			receptor				
PAK_01850	PA3340	98,7	Pilus assembly protein (FimV like)	4	44	U/MLS	Membrane proteins
PAK_04298	PA1084	100	Flagellar P-ring protein (FlgI)	4	41	P	Cell wall / LPS / capsule-Motility & Attachment
PAK_00580	PA0366	100	Aldehyde dehydrogenase	3	40	C	Putative enzymes
PAK_02050	PA3139	99,8	Aromatic amino acid aminotransferase	4	40	C	Amino acid biosynthesis and metabolism-Putative enzymes
PAK_01585	PA3602	100	Glutamate synthase (YerD)	4	38	C/OMV	Membrane proteins
PAK_01921	PA3271	99,8	Histidine kinase	4	38	CM/OMV	Two-component regulatory Systems
PAK_02278	PA2920	100	Chemotaxis transducer	3	37	CM	Adaptation, Protection-Chemotaxis
PAK_01227	PA3590	99,8	ATP-dependent RNA helicase	4	36	C	Transcription, RNA processing and degradation
PAK_01841	PA3349	100	Chemotaxis protein	3	34	CM	Adaptation, Protection-Chemotaxis
PAK_04976	PA4514	99,7	Ligand-gated channel protein	3	34	OM/OMV	Transport of small molecules
PAK_00865	PA0652	100	Cyclic AMP receptor protein (VfR)	4	33	C	Transcriptional regulators
PAK_05306	PA4808	99,6	L-seryl-tRNA(Sec) selenium transferase (SelA)	4	32	C	Translation, post-translational modification, degradation
PAK_01441	PA3745	100	30S ribosomal protein S16 (RpsP)	3	31	C	Translation, post-translational modification, degradation-DNA replication, recombination, modification and repair
PAK_01982	PA3214	100	ABC transporter	4	31	U	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_01330	PA3884	100	C4-dicarboxylate ABC transporter substrate-binding protein	4	31	C/OMV	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_00573	PA0359	100	Multidrug transporter	3	31	CM	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_03260	PA2072	99,3	Histidine kinase	4	30	CM	Membrane proteins
PAK_00899	PA4272	100	50S ribosomal protein L10 (RplJ)	3	29	C	Translation, post-translational modification, degradation
PAK_03022	PA2290	99,6	Glucose dehydrogenase	3	29	CM/OMV	Carbon compound catabolism/Energy metabolism
PAK_01662	PA3526	99,7	Membrane protein	4	29	OM	Membrane proteins
PAK_04818	PA4360	99,4	ATPase OS=Pseudomonas	4	28	U/OMV	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_05875	PA5361	100	Histidine kinase (PhoR)	4	28	CM	Two-component regulatory Systems
PAK_05105	PA4635	100	Membrane protein (MgtC)	4	28	CM	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_04568	ausente		N-6 DNA methylase	3	28		
PAK_04361	PA4361	100	3-beta hydroxysteroid	4	27	C	Putative enzymes

04820			dehydrogenase				
PAK_02678	PA2623	100	Isocitrate dehydrogenase [NADP] (IcdA)	3	27	C/OMV	Carbon compound catabolism-Energy metabolism-Amino acid biosynthesis and metabolism
PAK_04920	PA4459	100	Lipopolysaccharide export system protein (LptC)	4	27	U	Hypothetical, unclassified, unknown
Y880_01172_60	PA1791	99,7	Membrane protease subunit, stomatin/prohibitin	3	27	U/OMV	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_00397	PA0180	99,7	Chemotaxis transducer (CttP)	3	26	CM	Adaptation, Protection-Chemotaxis
PAK_02120	ausente		Uncharacterized protein	3	26		
PAK_04850	PA4390	100	Uncharacterized protein	3	26	U/OMV	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_02358	PA2840	100	ATP-dependent RNA helicase (DeaD)	4	24	C/OMV	Transcription, RNA processing and degradation
PAK_00901	PA4270	99,9	DNA-directed RNA polymerase subunit beta (RpoB)	3	24	C/OMV	Transcription, RNA processing and degradation
PAK_04270	PA1101	99,7	Flagellar M-ring protein (FliF)	3	24	CM/OM	Cell wall / LPS / capsule-Motility & Attachment
PAK_05460	PA4955	99,6	Histidine kinase	4	24	CM	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_00702	PA0486	99,7	Serine/threonine protein kinase	4	24	C	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_03581	PA1766	100	Alpha-L-glutamate ligase	3	23	C	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_05045	PA4579	99,8	Membrane protein	4	23	U/MLS/P	Hypothetical, unclassified, unknow
Y880_01264_50	PA0156	100	RND transporter	4	23	U/MLS	Membrane proteins-Antibiotic resistance and susceptibility
PAK_01881	PA3309	100	Uncharacterized protein	3	23	C/OMV	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_05018	PA4552	99,7	Uncharacterized protein (PilW)	4	23	U	Motility & Attachment
PAK_02213	PA2982	100	Biopolymer transporter (ExbD)	4	22	U	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_03927	PA1433	99,2	Transcriptional regulator (DeoR)	4	22	CM	Membrane proteins
PAK_00731	PA0516	99,2	Heme d1 biosynthesis protein (NirF)	4	22	C/OMV	Energy metabolism-Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers
Y880_01054_45	PA3339	99,9	Membrane protein (Fragment) (PlpD)	3	21	OM/OMV	Membrane proteins-Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)
Y880_01043_80	PA3141	98,4	Membrane protein (WbpM)	3	21	CM/OMV	Putative enzymes-Membrane proteins-Cell wall / LPS / capsule
PAK_05880	PA5366	100	Phosphate import ATP-binding protein (PstB)	3	21	CM	Membrane proteins-Transport of small molecules

PAK_04886	PA4426	100	Phospholipid-binding protein	3	21	P/OMV	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_01256	PA3921	99,9	Transcriptional regulator	3	21	U/MLS	Transcriptional regulators
PAK_01517	PA3760	99,5	ABC transporter	3	20	CM	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_05735	PA5224	99,8	Aminopeptidase	3	20	C	Translation, post-translational modification, degradation
PAK_01192	PA3984	100	Apolipoprotein N-acyltransferase (Lnt)	3	20	CM/OMV	Cell wall / LPS / capsule-Translation, post-translational modification, degradation
PAK_01063	PA4112	99,7	ATPase	4	20	C/CM	Two-component regulatory systems
PAK_03580	PA1767	100	Membrane protein	3	20	CM/OMV	Membrane proteins
PAK_04214	PA1156	100	Ribonucleoside-diphosphate reductase (NrdA)	3	20	C/OMV	Nucleotide biosynthesis and metabolism
PAK_03632	PA1716	100	Secretin (PscC)	4	20	OM	Protein secretion/export apparatus
PAK_04043	PA1324	99,4	Uncharacterized protein	4	20	U	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_03532	PA1807	99,6	ABC transporter ATP-binding protein	4	19	CM/OMV	Transport of small molecules
PAK_05681	PA5171	99,5	Arginine deiminase (ArcA)	3	19	C/OMV	Amino acid biosynthesis and metabolism
PAK_01719	PA3466	100	ATP-dependent RNA helicase	3	19	C	Transcription, RNA processing and degradation
PAK_05440	PA4937	99,6	Ribonuclease R (Rnr)	3	19	C	Transcription, RNA processing and degradation
PAK_01957	PA3239	100	ABC transporter	3	18	OM	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_04499	PA0887	100	Acetyl-coenzyme A synthetase (AcsA)	3	18	C	Carbon compound catabolism-Central intermediary metabolism
PAK_2368	PA2830	100	Protease (HtpX)	4	18	CM/OMV	Adaptation, Protection
PAK_01359	PA3820	100	Protein-export membrane protein (SecF)	3	18	CM	Protein secretion/export apparatus
PAK_05285	PA4787	100	AraC family transcriptional regulator	3	17	C	Transcriptional regulators
PAK_00216	PA0001	100	Chromosomal replication initiator protein (DnaA)	3	17	C	DNA replication, recombination, modification and repair
PAK_05223	PA4727	100	Poly(A) polymerase I (PcnB)	3	17	C	Transcription, RNA processing and degradation
PAK_03879	PA1481	100	Thiol:disulfide interchange protein (CcmG)	3	17	CM	Translation, post-translational modification, degradation-Chaperones & heat shock proteins-Energy metabolism
PAK_05485	PA4953	100	Flagellar motor protein (MotB)	3	16	CM	Membrane proteins-Adaptation, Protection-Chemotaxis
PAK_	PA4326	100	Lipoprotein	3	16	U	Hypothetical, unclassified,

04784							unknown
PAK_00589	PA0374	100	Cell division ATP-binding protein (FtsE)	3	15	CM	Transport of small molecules-Cell division
PAK_03739	PA1161	99,5	Histidine kinase	3	15	C/CM	Transcriptional regulators-Two-component regulatory systems-Chemotaxis-Motility & Attachment-Cell wall / LPS / capsule
PAK_00676	PA0461	99,7	Acyltransferase	3	14	CM	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_04274	PA1097	100	ATPase AAA (FleQ)	3	14	C	Motility & Attachment-Transcriptional regulators
PAK_03895	PA1465	100	Chemotaxis protein	3	14	U	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_00263	PA0045	100	Curli production assembly protein (CsgG)	3	14	U/OMV	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_05274	PA4777	99,8	Histidine kinase (PmrB)	3	14	CM/OMV	Two-component regulatory Systems
PAK_05418	PA4915	99,6	Chemotaxis protein	3	13	OM	Adaptation, Protection-Chemotaxis
PAK_05031	PA4565	100	Glutamate 5-kinase (ProB)	3	13	C	Amino acid biosynthesis and metabolism
PAK_03514	PA1825	99,5	Membrane protein	3	13	CM	Membrane proteins
PAK_03507	PA1832	99,7	Peptidase	3	13	CM/OMV	Putative enzymes
PAK_03881	PA1479	99,4	Cytochrome c-type biogenesis protein (CcmE)	3	12	U	Energy metabolism
PAK_04858	PA4398	100	Histidine kinase	3	12	CM	Two-component regulatory Systems
PAK_04001	PA1365	99,8	Membrane protein	3	12	OM	Transport of small molecules
PAK_03420	PA1913	99,6	Uncharacterized protein	3	12	U	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_02738	PA2567	99,7	EAL domain-containing protein	3	11	CM	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_01924	PA3268	99,7	Amino acid ABC transporter substrate-binding protein (FecA)	3	10	OM/OMV	Membrane proteins/Transport of small molecules
PAK_05012	PA4546	99,6	Histidine kinase (PilS)	3	9	CM	Two-component regulatory Systems
PAK_03828	ausente	-	Uncharacterized protein	3	9	-	-
PAK_05508	PA5001	100		3	8	C	Hypothetical, unclassified, unknown

Se consideraron aquellas proteínas presentes en al menos 3 de 4 réplicas de la cepa WT y en 0 ó 1 réplica de la cepa PDE⁺.

^a Las búsquedas fueron realizadas utilizando una base de datos de la cepa PAK. Se realizó una comparación de secuencias (*Pseudomonas database blast*) para identificar el gen en la cepa PAO1.

^b La anotación de la proteína se obtiene de la búsqueda en base de datos de la cepa PAK y en caso de no existir, de su homólogo en PA01.

^c señal total corresponde con la sumatoria del número de espectros asignados a cada proteína en las distintas réplicas y es una medida de su abundancia relativa.

†La localización se reportó de acuerdo a la base de datos *Pseudomonas database*: C: Citoplásmica; CM: Membrana citoplásmica; OMV: Vesículas de membrana externa; OM: Membrana externa; U: Indeterminada; MLS: Múltiples sitios de localización; P: Periplásmica; E: extracelular; F: Flagelo.

Tabla 9. Proteínas identificadas exclusivamente en la fracción de membrana de la cepa PDE⁺ en análisis proteómicos de tipo *shotgun*.

Gen en PAK	Gen en PA01 ^a	% de homología	Proteína identificada ^b	Nº de réplicas	Señal total ^c	Localización [†]	<i>PseudoCAP function</i>
PAK_03199	PA2133	100	Diguanylate phosphodiesterase	4	411	CM	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_00629	PA0413	98,8	Chemotaxis protein (ChpA)	4	138	C	Two-component regulatory systems-Chemotaxis-Motility & Attachment
PAK_04892	PA4432	100	30S ribosomal protein S9 (RpsI)	4	55	C/OMV	Translation, post-translational modification, degradation
PAK_05241	PA4745	100	Transcription termination/antitermination protein (NusA)	3	43	C/OMV	Transcription, RNA processing and degradation
PAK_04375	PA1011	100	Uncharacterized protein	3	41	OM/OMV	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_00606	PA0391	99,7	GTPase	3	40	C	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_05751	PA5239	100	Transcription termination factor (Rho)	3	39	C/CM	Transcription, RNA processing and degradation
PAK_05253	PA4756	100	Carbamoyl-phosphate synthase (glutamine-hydrolyzing) (CarB)	4	37	C/OMV	Nucleotide biosynthesis and metabolism/Amino acid biosynthesis and metabolism
PAK_05112	PA4640	100	Probable malate:quinone oxidoreductase (Mqo)	3	36	C/OMV	Central intermediary metabolism-Energy metabolism
PAK_01247	PA3930	100	Cyanide insensitive (CioA)	3	34	CM	Energy metabolism
PAK_05448	PA4943	99,5	GTPase (HflX)	4	34	C	Putative enzymes
PAK_02132	PA3062	100	Lipoprotein (PelC)	3	34	OM	Cell wall / LPS / capsule
PAK_04863	PA4403	100	Protein translocase subunit (SecA)	4	33	C/OMV	Protein secretion/export apparatus
PAK_02131	PA3063	99,8	Biofilm formation protein PelB	3	32	U-MLS	Cell wall / LPS / capsule
PAK_00779	PA0563	100	Membrane protein	3	31	CM	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_01444	PA3742	100	50S ribosomal protein L19 (RplS)	4	30	C	Translation, post-translational modification, degradation
PAK_00219	PA0004	100	DNA gyrase subunit B (GyrB)	3	30	C	DNA replication, recombination, modification and repair
PAK_04609	PA4609	99,8	DNA repair protein (RadA)	3	30	U	DNA replication,

05077							recombination, modification and repair
PAK_05548	PA5041	100	Pilus assembly protein (PilP)	3	30	CM	Motility & Attachment
PAK_05559	PA5052	100	Cell division protein	4	28	CM/OMV	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_04974	PA5231	99,9	Aspartyl beta-hydroxylase	3	27	CM	Membrane proteins-Transport of small molecules
PAK_02067	PA3126	100	Heat-shock protein (LbpA)	3	27	C	Chaperones & heat shock proteins
PAK_00903	PA4268	99,1	30S ribosomal protein S12 (RpsL)	4	26	C	Translation, post-translational modification, degradation
PAK_04417	PA0963	100	Aspartyl-tRNA synthetase (AspS)	3	25	C/OMV	Transcription, RNA processing and degradation-Translation, post-translational modification, degradation
PAK_04494	PA0892	100	Amino acid transporter (AotP)	3	23	CM	Transport of small molecules
PAK_04446	PA0936	99,7	Aspartyl beta-hydroxylase (LpoX)	3	23	CM/OMV	Putative enzymes-Cell wall / LPS / capsule
PAK_00924	PA4727	100	50S ribosomal protein L18 (RplR)	3	22	C	Translation, post-translational modification, degradation
PAK_03371	PA1964	100	ABC transporter ATP-binding protein	3	22	C	Transport of small molecules
PAK_04483	PA0903	99,8	Alanine--tRNA ligase (AlaS)	3	22	C	Transcription, RNA processing and degradation/Translation, post-translational modification, degradation
PAK_02243	PA2952	100	Electron transfer flavoprotein subunit beta (EtfB)	3	22	U/OMV	Energy metabolism
PAK_01493	PA3694	100	Uncharacterized protein	4	22	U	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_01952	PA3244	100	Site-determining protein	3	21	C/CM	Cell division
PAK_00645	PA0429	99,7	Uncharacterized protein	3	21	C	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_00065	PA5429	100	Aspartate ammonia-lyase (AspA)	3	20	C/OMV	Amino acid biosynthesis and metabolism
PAK_05504	PA4997	100	Lipid A export ATP-binding/permease protein (MsbA)	3	20	CM/OMV	Fatty acid and phospholipid metabolism-Transport of small molecules-Cell wall / LPS / capsule
PAK_03763	PA1588	100	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] (SucC)	3	20	C	Energy metabolism
PAK_01929	PA9263	99,7	Recombination-associated protein (RdgC)	3	19	C/P	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_05443	PA4938	99,8	Adenylosuccinate synthetase (PurA)	3	17	C	Amino acid biosynthesis and metabolism-Nucleotide biosynthesis and metabolism
PAK_04955	PA4494	100	Histidine kinase (RoxS)	3	17	CM	Two-component regulatory systems
PAK_05305	PA4807	99,8	Selenocysteine-specific translation elongation	3	17	C	Translation, post-translational modification, degradation

			factor				
PAK_05720	PA5209	99,1	Adenylate cyclase	3	16	U/MLS	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_05007	PA4542	100	Chaperone protein (ClpB)	3	16	C	Translation, post-translational modification, degradation
PAK_01422	PA3763	99,8	Phosphoribosylformylglycinamide synthase (PurL)	3	16	C	Nucleotide biosynthesis and metabolism
PAK_03601	PA1746	100	Appr-1-p processing protein	3	15	C/OMV	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_01178	PA3999	100	D-Ala-D-Ala-carboxypeptidase (DacC)	3	15	CM/P/OMV	Cell wall / LPS / capsule
PAK_02044	ausente		Glycosyl transferase family	3	14		
PAK_00917	PA4254	100	30S ribosomal protein S17 (RpsQ)	3	13	C	Translation, post-translational modification, degradation
PAK_01156	PA4021	99,5	Transcriptional regulator	3	13	C	Transcriptional regulators
PAK_04464	PA0919	99,5	Uncharacterized protein	3	13	U/OMV	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_03506	PA1833	99,7	Oxidoreductase	3	12	C	Putative enzymes
PAK_04641	PA0768	100	Signal peptidase I (LepB)	3	12	CM/OMV	Translation, post-translational modification, degradation-Protein secretion/export apparatus
PAK_03517	PA1822	100	Ferrous iron transporter B (FimL)	3	11	C	Motility & Attachment
PAK_00571	PA0357	100	Formamidopyrimidine-(MutM)	3	10	C	DNA replication, recombination, modification and repair
PAK_03325	PA2009	100	Homogentisate 1,2-dioxygenase (HmgA)	3	10	U	Carbon compound catabolism
PAK_01451	PA3736	100	Homoserine dehydrogenase (Hom)	3	10	C	Amino acid biosynthesis and metabolism
PAK_02767	PA2542	99,2	Uncharacterized protein	3	10	OM	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_02657	PA2644	100	NADH-quinone oxidoreductase subunit I (NuoI)	3	9	C	Energy metabolism

Se consideraron aquellas proteínas presentes en al menos 3 de 4 réplicas de la cepa PDE⁺ y en 0 ó 1 réplica de la cepa WT.

^a Las búsquedas fueron realizadas utilizando una base de datos de la cepa PAK. Se realizó una comparación de secuencias (*Pseudomonas database blast*) para identificar el gen en la cepa PA01.

^b La anotación de la proteína se obtiene de la búsqueda en base de datos de la cepa PAK y en caso de no existir, de su homólogo en PA01.

^c señal total corresponde con la sumatoria del número de espectros asignados a cada proteína en las distintas réplicas y es una medida de su abundancia relativa.

†La localización se reportó de acuerdo a la base de datos *Pseudomonas database*: C: Citoplasmática; CM: Membrana citoplasmática; OMV: Vesículas de membrana externa; OM: Membrana externa; U: Indeterminada; MLS: Múltiples sitios de localización; P: Periplásmica; E: extracelular; F: Flagelo.

En el caso de las proteínas diferenciales presentes sólo en WT, las mayores señales (en el entorno de los 100 espectros) se corresponden con receptores de quimiotaxis. En particular se observó que 17 receptores de quimiotaxis que están presentes en la cepa WT no se detectaron en la cepa PDE⁺. Por otra parte, a partir de los datos de localización subcelular se determinó que el 39% de las proteínas presentes sólo en la cepa WT corresponden a proteínas de membrana (20% membrana externa 19% membrana interna) mientras que el resto corresponde a una fracción diferente (33% citoplasmática; 16% vesículas de membrana externa; 8% indeterminada; 2% poseen múltiples sitios de localización; 1% periplásmicas; 1% extracelulares) La distribución de las distintas localizaciones observadas se resume en la figura 21.

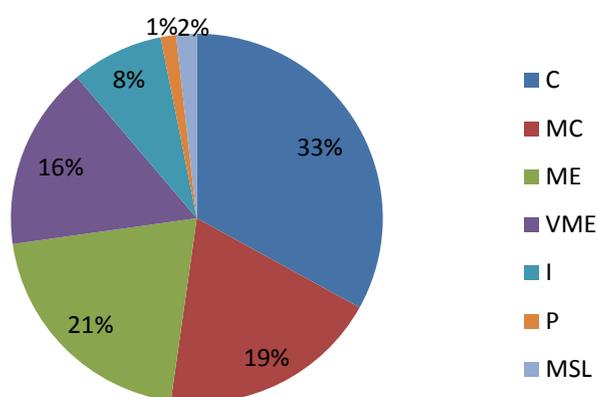


Figura 21. Clasificación de las proteínas presentes exclusivamente en la fracción de membrana de la cepa WT

Representación esquemática de la localización subcelular. C: Citoplásmica; MC: Membrana citoplásmica; ME: membrana externa; VME: Vesículas de membrana externa; I: Indefinida; P: Periplásmica; MSL: Múltiples sitios de localización

Las proteínas presentes únicamente en la cepa PDE⁺, se identificaron con una señal total que varió desde 411 para las proteínas más abundantes hasta 9 para las menos abundantes. Las proteínas diferenciales más abundantes correspondieron a la fosfodiesterasa de di-GMPc PA2133 y ChpA (con una señal total de 138). Estas proteínas fueron previamente identificadas por nosotros como sobrerrepresentadas en PDE⁺ durante el análisis de la fracción de proteínas de membrana insoluble en buffer 2D. Por otra parte, a partir de la información de localización subcelular recabada para las proteínas presentes solamente en la cepa PDE⁺, se determinó que tan sólo 30% (13% membrana citoplasmática, 17% membrana externa) corresponden a proteínas de

membrana, mientras que el 70% corresponden a una fracción diferente (44% citoplásmicas; 15% vesículas de membrana externa; 7% indeterminada; 2% poseen múltiples sitios de localización; 1% periplásmicas). La distribución de las distintas localizaciones observadas se resume en la figura 22.

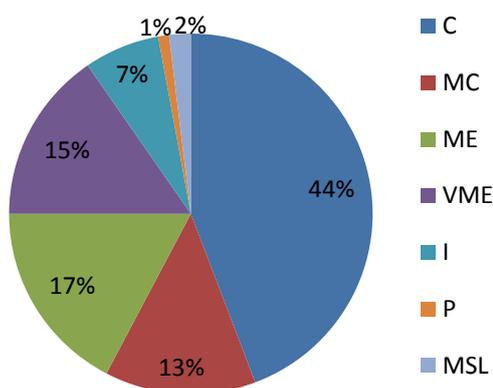


Figura 22. Clasificación de las proteínas presentes exclusivamente en la fracción de membrana de la cepa PDE⁺.

Representación esquemática de la localización subcelular. C: Citoplásmica; MC: Membrana citoplásmica; ME: membrana externa; VME: Vesículas de membrana externa; I: Indefinida; P: Periplásmica; MSL: Múltiples sitios de localización

El análisis de la fracción de proteínas de membrana mediante la aproximación *shotgun* permitió identificar varias proteínas diferenciales que se corresponden con proteínas citosólicas. La identificación de estas proteínas no es inesperada, ya que la técnica utilizada es muy sensible, permitiendo detectar diferencias en proteínas muy poco abundantes en la fracción. Estas proteínas se encontraron sistemáticamente en las muestras provenientes de una cepa y no de la otra y por tanto se consideraron en el análisis, aun cuando no podamos a partir de nuestros datos concluir si su detección en esta fracción se debe a un cambio en sus niveles de expresión o localización. De todas maneras cabe destacar que las proteínas más abundantes en la fracción de membrana, (y que resultaron mayoritariamente incambiadas en ambas cepas) se corresponden a proteínas de membrana. Estos datos están en concordancia con lo observado en los geles 2D, donde las proteínas más abundantes corresponden a proteínas de membrana y no están modificadas por la sobreexpresión de la proteína PA2133.

Por otro lado se realizó un análisis cuantitativo para evaluar la abundancia relativa de aquellas proteínas presentes en ambas cepas. Para ello se utilizó el módulo *TC fold* del programa PatternLab. Éste módulo permite comparar el número de espectros que se asignan a cada proteína en cada condición y para cada réplica de la misma. El número de espectros asignados a una proteína representa una medida de su abundancia relativa en la mezcla (Liu et al 2004). El modulo *TC fold* permite hacer un análisis estadístico del las diferencias observadas en el número de espectros de cada proteína en cada situación y entre situaciones. En este trabajo, se cuantificaron los niveles de las proteínas que estaban presentes en al menos tres réplicas de cada condición (BH q-value <0,05). La figura 23 muestra el diagrama de volcán, donde se correlaciona la tasa de cambio con la significancia estadística para cada proteína identificada (representada por un punto). Las proteínas indicadas en rojo no satisfacen el criterio de tasa de cambio y se detectan con el mismo nivel en ambas cepas. Las proteínas indicadas con verde, satisfacen el criterio de tasa de cambio pero probablemente por azar, ya que no satisfacen el criterio estadístico. Las indicadas en color azul y en naranja satisfacen ambos criterios, el estadístico y la tasa de cambio. Las representadas en naranja se encuentran en muy baja cantidad y requieren verificación experimental adicional, las proteínas indicadas en azul representan las proteínas diferenciales entre ambas cepas y se muestran en la tabla 10. En este sentido, la proteína que presenta mayor tasa de cambio se encontró sobrerrepresentada en WT y corresponde a *Type A flagellin* (tasa de cambio de 11,4). Ésta proteína se identificó también en un spot diferencial en el análisis por 2D-DIGE.

Tasa de cambio vs. probabilidad

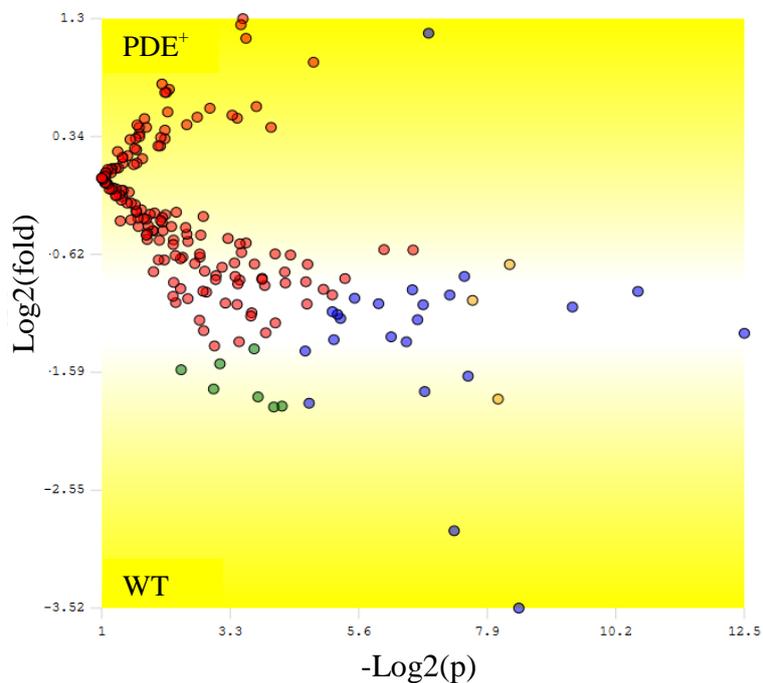


Figura 23. Análisis proteómico cuantitativo de fracciones de proteínas de membrana por recuento de espectros.

Se muestra un diagrama volcán generado utilizando el módulo *TC fold* del programa PatternLab. Se analiza la tasa de cambio de las proteínas presentes en al menos 3 de 4 réplicas de las cepas WT y PDE⁺ en base al recuento de espectros. Cada punto representa una proteína presente en WT y PDE⁺ de acuerdo a su $-\log_2(p)$ (eje x) su \log_2 (tasa de cambio) (eje y). La identidad de las proteínas identificadas se muestra en la tabla 10.

Tabla 10: Análisis cuantitativo de las proteínas presentes en la fracción de membrana de ambas cepas.

Gen en PAK	Gen en PA01 ^a	% homología	Proteína identificada ^b	<i>p-value</i>	Señal WT ^c	Señal PDE ^{+c}	Tasa de cambio ^d	Sobre-representada en	Localización [†]
PAK_04280	ausente	-	A-type flagellin	0,00283	351,0	30,7	11,4	WT	F ^c
PAK_04767	PA4310	99,5	Chemotaxis protein (Fragment)	0,00632	32,0	4,3	7,4	WT	CM
PAK_05618	PA5112	100,0	Esterase	0,01061	40,5	21,5	1,9	WT	OM/OM V
PAK_04422	PA0958	94,6	Porin D	0,00668	398,8	205,5	1,9	WT	OM/OM V
PAK_00288	PA0070	99,7	Uncharacterized protein	0,00065	33,8	17,8	1,9	WT	U/OMV
PAK_03801	PA1552	100,0	Cbb3-type cytochrome c oxidase subunit	0,03820	21,5	6,0	3,6	WT	U/OMV
PAK_01389	PA3790	99,9	TonB-dependent copper receptor OprC	0,04011	183,3	68,8	2,7	WT	OM/OM V
PAK_00501	PA0291	100,0	Anaerobically-induced outer membrane porin OprE	0,00557	115,3	66,0	1,7	WT	OM/OM V
PAK_05479	PA4974	97,3	Channel protein TolC	0,01143	53,8	21,3	2,5	WT	OM/OM V
PAK_00642	PA0426	99,9	Multidrug resistance protein MexB	0,00911	27,7	8,3	3,4	WT	CM/OM V
PAK_03021	PA2291	99,8	Porin B	0,01381	22,8	9,3	2,5	WT	OM
PAK_04891	PA4431	100,0	Ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit	0,02811	70,0	28,0	2,5	WT	CM/OM V
PAK_02526	PA2760	100,0	Membrane protein OprD	0,00017	155,5	64,5	2,4	WT	OM/OM V
PAK_05258	PA4761	100,0	Chaperone protein DnaK	0,00868	10,7	24,3	2,3	PDE+	C/OMV
PAK_04554	PA0833	100,0	Cell envelope biogenesis protein OmpA	0,02589	92,0	41,5	2,2	WT	OM/OM V
PAK_01111	PA4067	100,0	Membrane protein	0,00532	145,3	47,3	3,1	WT	OM/OM V
PAK_01539	PA3648	98,5	Outer membrane protein assembly factor BamA	0,00995	55,3	24,8	2,2	WT	OM/OM V
PAK_04962	PA4501	96,7	Porin	0,02688	104,0	48,0	2,2	WT	OM
PAK_04079	PA1288	99,8	Long-chain fatty acid transport protein	0,02865	72,5	34,0	2,1	WT	OM/OM V
PAK_04192	PA1178	100,0	Membrane protein Pho P/Q	0,00146	612,8	295,0	2,1	WT	OM/OM V
PAK_00643	PA0727	100,0	Multidrug transporter OprM	0,00929	81,0	39,5	2,1	WT	OM/OM V
PAK_05133	PA4661	100,0	Lipid A deacylase	0,01614	39,8	19,5	2,0	WT	OM/OM V
PAK_04342	PA1041	100,0	Membrane protein	0,02174	81,0	41,0	2,0	WT	OM

Se consideran las proteínas presentes en 3 de 4 réplicas por clase, y que cumplen con los criterios de tasa de cambio y estadístico de acuerdo al modulo TCfold del programa PatternLab (ver materiales y métodos)

^a Las búsquedas fueron realizadas utilizando una base de datos de la cepa PAK. Se realizó una comparación de secuencias (*Pseudomonas database blast*) para identificar el gen en la cepa PAO1.

^b La anotación de la proteína se obtiene de la búsqueda en base de datos de la cepa PAK y en caso de no existir, de su homólogo en PAO1.

^c sumatoria del número de espectros asignados a cada proteína en las distintas réplicas dividido en número de replicas de esa clase.

^d Cociente entre la señal en la condición sobrerrepresentada y la condición subrepresentada

†La localización se reportó de acuerdo a la base de datos *Pseudomonas database* C: Citoplasmática; CM: Membrana citoplasmática; OMV: Vesículas de membrana externa; OM: Membrana externa; U: Indeterminada; MLS: Múltiples sitios de localización; P: Periplásmica; E: extracelular; F: Flagelo.

^e En el caso de algunas proteínas el flagelo que carecen de homólogos en PAO1, la localización corresponde a la reportada en PAK..

El análisis mediante un abordaje de tipo *shotgun* permitió confirmar algunas de las diferencias observadas en los geles de DIGE e identificar nuevos procesos regulados por di-GMPc. En particular ambos análisis proteómicos apuntan a una deficiencia en la expresión de flagelo en la cepa PDE⁺.

Por otra parte, el análisis de tipo *shotgun* de la fracción de membrana además permitió identificar que la sobreexpresión de la proteína PA2133 inhibe la expresión de 17 MCPs que sólo se detectaron en la cepa WT. Entre ellas se encuentran PctA, PctB y PctC que poseen un rol demostrado en la quimiotaxis hacia aminoácidos (Reyes-Darias et al 2015).

2.2-Exoproteínas

a. Separación de exoproteínas en geles bidimensionales

Las exoproteínas obtenidas a partir del sobrenadante de cultivos líquidos se cuantificaron mediante densitometría a partir de geles de SDS PAGE como se explicó en materiales y métodos. (ver tabla 11). La separación se realizó en un gradiente de pH 3-10 lineal y geles de 12% de acrilamida. En la figura 24 se pueden observar geles representativos para esta fracción. Si bien el patrón de exoproteínas es muy similar para ambas cepas, se observan algunas diferencias puntuales por comparación de los geles de Coomassie. Dado que las proteínas se distribuyen uniformemente a lo largo del gel, se decidió utilizar estas mismas condiciones para analizar estas diferencias de forma cuantitativa mediante 2D DIGE.

Tabla 11: Concentración de exoproteínas determinada por densitometría de geles de SDS PAGE.

Extracto	[Proteínas] ($\mu\text{g/mL}$)
WT 1	1,64
WT 2	1,97
WT 3	1,55
WT 4	1,28
PDE ⁺ 1	1,58
PDE ⁺ 2	2,02
PDE ⁺ 3	1,39
PDE ⁺ 4	1,08

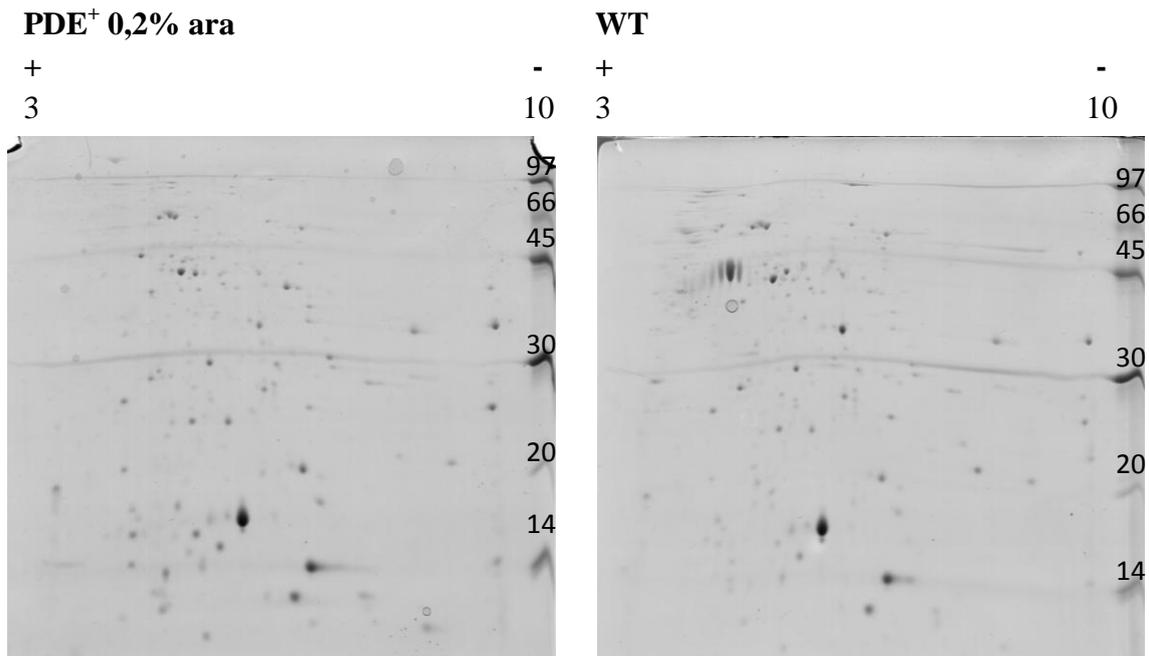


Figura 24. Separación de exoproteínas de las cepas WT y PDE⁺ por electroforesis bidimensional.

Imagen representativa de la separación de exoproteínas en geles 2D teñidos con azul de Coomassie, gradiente de pH3-10 y 12% de acrilamida. Izquierda: PDE⁺ 0,2% arabinosa. Derecha: WT. A la derecha de cada gel se observa el marcador de masa molecular.

b. Análisis proteómico comparativo de exoproteínas por 2D DIGE

El marcaje con fluoróforos, la primer y segunda dimensión, así como el análisis de imágenes y la identificación de proteínas por espectrometría de masa se llevaron a cabo como se explicó para proteínas de membrana. Geles representativos se muestran en la figura 25. En los geles de exoproteínas se detectaron 823 *spots* totales consistentemente en los 4 geles, de los cuales 27 fueron diferencialmente expresados (15 en WT y 12 en PDE⁺). De estos 27 *spots* diferenciales, sólo fue posible cortar 10 a partir de un gel preparativo teñido con azul de Coomassie. La tasa de cambio observada para estos *spots* fue variable, siendo el valor mínimo de 1,63 para el *spot* 10 y el máximo de 15,20 para el *spot* 7. En la tabla 12 se muestra la lista de las proteínas identificadas incluyendo para cada caso los datos de cobertura de secuencia, *Mascot score*, número de péptidos asignados, valor p, tasa de cambio y localización subcelular. A partir de esos 10 *spots* se identificaron 5 proteínas diferenciales, 2 de ellas sobreexpresadas en PDE⁺ (CdrA y OprG) y 3 en WT (*Type A flagellin*, *A type flagellar hook associated protein* y PA0572). PA0572 es una proteína de función desconocida. *A type flagellar hook associated protein* es una proteína estructural del flagelo (Arora et al 2000). La figura

25 muestra la vista 3D de 3 de los 10 *spots* señalados en el gel, correspondientes a *Type A flagellin*, *A type flagellar hook associated protein* y CdrA. Allí se observa claramente la diferencia en el volumen relativo para un mismo *spot* en ambas cepas de estudio. En concordancia con los resultados del análisis proteómico de la fracción de membrana, observamos que la sobreexpresión de PA2133 afecta la presencia de proteínas estructurales del flagelo en la fracción de exoproteínas. Por otra parte identificamos que CdrA, una adhesina filamentosa, está claramente sobrerrepresentada en la fracción de exoproteínas de la cepa PDE⁺. Curiosamente, analizando la fracción de proteínas de membrana de la misma cepa encontramos que CdrB, el gen contiguo y responsable de la secreción de CdrA, está sobrerrepresentado en la fracción de membrana. En conjunto, nuestros resultados apuntan a que la síntesis de estos dos componentes está alterada en la cepa que sobreexpresa la proteína PA2133.

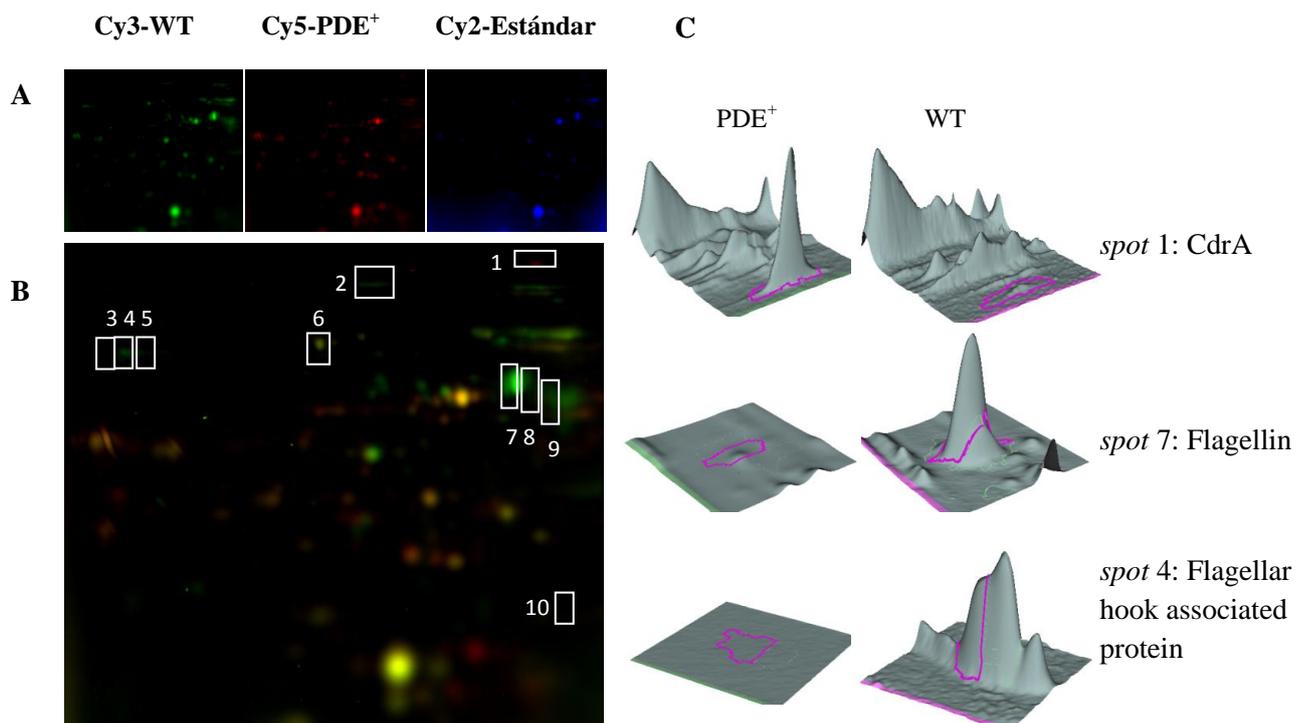


Figura 25. 2D-DIGE de la fracción de exoproteínas.

A-Imágenes representativas para geles de gradiente de pH 3-10 y 12% de acrilamida. Se muestra la detección diferencial sobre el mismo gel de las proteínas provenientes de las distintas condiciones: rojo: WT (Cy3); verde: PDE⁺ (Cy5); azul: Estándar interno (Cy2).

B-Imágenes superpuestas de Cy3 y Cy5. El análisis de las imágenes obtenidas a partir de los 4 geles del experimento permitió detectar 823 *spots* de los cuales 27 se encontraron diferencialmente representados considerando una tasa mínima de cambio de $\pm 1,25$ y $p < 0,05$.

Los *spots* indicados se cortaron para su análisis por espectrometría de masa. La identidad de las proteínas contenidas en dichos *spots*, así como la tasa de cambio del mismo se resume en la tabla 12. C-Representación 3D de la abundancia relativa de algunos spots señalados en B.

Tabla 12. Proteínas presentes en los spots diferenciales de la fracción de exoproteínas de las cepas WT y PDE⁺ analizadas por 2D DIGE

Nº en el gel	Gen en PAK	Gen en PA01	Proteína identificada ^a	Cobertura de secuencia	Mascot protein score*	Nº de péptidos asignados	<i>p-value</i>	Tasa de cambio	Sobre-representada en
1	PAK_05095	PA4625	Hemagglutinin (CdrA)	18%	142	11	0,009	4,08	PDE ⁺
2	PAK_00788	PA0572	Uncharacterized	20%	249	9	0,025	2,47	WT
3	PAK_04278	ausente ^b	A-type flagellar hook-associated protein	49%	281	17	0,01	4,45	WT
4	PAK_04278	ausente ^b	A-type flagellar hook-associated protein	24%	110	7	0,01	11,2	WT
5	PAK_04278	ausente ^b	A-type flagellar hook-associated protein	38%	265	11	0,01	9,36	WT
6	PAK_04278	ausente ^b	A-type flagellar hook-associated protein	57%	411	26	0,03	6,0	WT
7	PAK_04280	ausente ^b	A-type flagellin	65%	239	17	0,003	15,2	WT
8	PAK_04280	ausente ^b	A-type flagellin	65%	378	17	0,0003	12,3	WT
9	PAK_04280	ausente ^b	A-type flagellin	38%	165	14	0,0094	8,37	WT
10	PAK_01111	PA4067	Membrane protein (OprG)	34%	203	7	0,033	1,63	PDE ⁺

^a La anotación de la proteína se obtiene de la búsqueda en base de datos de la cepa PAK y en caso de no existir de su homólogo en PA01.

^b La cepa PA01 posee flagelina de tipo B y por tanto no se identifica un homólogo a la flagelina de tipo A identificada en PAK.

* Todos los Mascot scores reportados fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

c. Análisis proteómico cuantitativo de exoproteínas por LC MS/MS.

Las fracciones de exoproteínas de las cepas WT y PDE⁺ fueron analizadas y procesadas como se describió para proteínas de membrana. Las proteínas presentes en cada réplica biológica se identificaron por comparación con una base de datos de la cepa PAK. Para las muestras de la cepa WT se identificaron 201, 290, y 279 proteínas utilizando el criterio de máxima parsimonia, como se describió para proteínas de membrana. Por otro lado en el caso de las réplicas de las muestras PDE⁺ se identificaron 136, 136, y 128 proteínas utilizando el mismo criterio estadístico. Si bien para el caso de la cepa WT se identificaron sistemáticamente más proteínas que para la cepa PDE⁺, cabe destacar que en ambos casos la cantidad de proteína analizada fue la misma, lo que sugiere que la complejidad del exoproteoma es menor en la cepa PDE⁺. Para el análisis con el módulo *Approximate area- proportional Venn diagram* del programa PatternLab se eligió como criterio seleccionar las proteínas que están presentes en al menos 2 de 3 réplicas de una condición y ausentes en la otra. El análisis muestra que 107 proteínas están presentes en ambas condiciones, 127 proteínas están presentes sólo en WT, y 15 sólo en PDE⁺. Las proteínas que se identificaron exclusivamente en WT se muestran en la tabla 13, mientras que la tabla 14 muestra las proteínas presentes únicamente en PDE⁺. Se muestra además el número de réplicas en las que se identificó cada proteína junto a su señal total función de cada proteína (*PseudoCAP function*) y localización subcelular.

Tabla 13. Proteínas identificadas exclusivamente en la fracción de exoproteínas de la cepa WT en análisis proteómicos de tipo *shotgun*.

Gen en PAK	Gen en PA01 ^a	% de homología	Proteína identificada ^b	Nº de réplicas	Señal total ^c	Localización [†]	<i>PseudoCAP function</i>
PAK_04280	ausente ^d		A-type flagellin	3	1649	F ^d	-
PAK_04378	ausente		A-type flagellar hook-associated protein 2	3	1152	F ^d	-
PAK_04296	ausente		Flagellar hook protein (FlgK)	3	341	F ^d	-
PAK_03464	PA1871	99	Peptidase M23 (LasA)	3	307	E/OMV	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)- Translation, post-translational modification, degradation
PAK_03642	PA1706	100	Type III secretion protein (PcrV)	3	180	E	Protein secretion/export apparatus
PAK_04295	ausente		Flagellar hook protein (FlgL)	3	139	F ^d	-
PAK_01337	PA3841	99,3	ADP-ribosyltransferase (ExoS)	3	121	E/HA	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)
PAK_	PA1709	100	AopD protein (PopD)	2	83	E/HA	Protein secretion/export

03639							apparatus
PAK_00838	ausente		Phage tail fiber protein	3	83		-
PAK_04302	PA1080	99,8	Flagellar hook protein (FlgE)	3	73	E/OMV	Cell wall / LPS / capsule-Motility & Attachment
PAK_03640	PA1708	99,5	Translocator protein PopB (PopB)	2	71	E/HA	Protein secretion/export apparatus
PAK_05540	PA5033	99,4	Uncharacterized protein	3	71	U	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_02678	PA2623	100	Isocitrate dehydrogenase [NADP] OS= <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (strain PAK)	2	60	C/OMV	Carbon compound catabolism-Energy metabolism-Amino acid biosynthesis and metabolism
PAK_00511	PA0301	100	Polyamine transporter (SpuE)	3	59	P	Transport of small molecules
PAK_00733	PA0518	100	Cytochrome C biogenesis protein (CcsA)	3	57	P	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers-Energy metabolism
PAK_02641	PA2659	100	Peptidase	2	57	U	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_00999	PA4175	99,6	Lysyl endopeptidase	3	56	E	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)
PAK_00065	PA5429	100	Aspartate ammonia-lyase (AspA)	2	54	C/OMV	Amino acid biosynthesis and metabolism
PAK_04279	ausente		FlaG	3	53	-	-
PAK_01839	PA3351	100	Flagellar biosynthesis anti-sigma factor (FlgM)	2	52	E	Transcriptional regulators
PAK_01246	PA3931	99,2	Methionine ABC transporter substrate-binding protein	3	49	U/MLS	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_00901	PA4270	99,9	DNA-directed RNA polymerase subunit beta (RpoB)	3	47	C/OMV	Transcription, RNA processing and degradation
PAK_01124	PA4053	100	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase (RibH)	3	46	C	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers
PAK_05007	PA4542	100	Chaperone protein (ClpB)	3	46	C	Translation, post-translational modification, degradation
PAK_05478	PA4973	100	Phosphomethylpyrimidine synthase (ThiC)	3	45	C	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers
PAK_05682	PA5172	100	Ornithine carbamoyltransferase (ArcB)	3	44	C/OMV	Amino acid biosynthesis and metabolism
PAK_04220	PA1148	99,5	Exotoxin A (ExoA)	3	42	OMV/E	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)
PAK_03754	PA1596	100	Chaperone protein (HtpG)	3	40	C/OMV	Chaperones & heat shock proteins
PAK_00935	PA4236	100	Catalase (CatA)	3	37	P/OMV/MLS	Adaptation, Protection
PAK_0836	PA0618	100	Baseplate assembly protein	3	36	C/OMV	Related to phage, transposon, or plasmid
PAK_05026	PA4560	99,8	Isoleucine--tRNA ligase (IleS)	3	34	C	Amino acid biosynthesis and metabolism-Translation, post-

							translational modification, degradation
PAK_04473	PA0910	98,8	Uncharacterized protein	3	34	U	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_05844	PA5330	100	Uncharacterized protein	3	33	U	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_01946	PA3250	100	ABC transporter substrate-binding protein	3	32	U	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK03130	PA2204	100	ABC transporter substrate-binding protein	3	32	P	Transport of small molecules
PAK_01897	PA3296	99,6	Alkaline phosphatase (PhoA)	3	31	P	Central intermediary metabolism
PAK_01804	PA3383	99,7	Alkylphosphonate ABC transporter substrate-binding protein	3	31	P	Transport of small molecules
PAK_03672	PA1677	100	Isochorismatase family hydrolase	3	30	C	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_00849	PA0633	100	Phage major tail protein	3	29	U/OMV	Related to phage, transposon, or plasmid
PAK_04030	PA1337	100	Glutaminase (AnsB)	3	28	P	Amino acid biosynthesis and metabolism
PAK_00217	PA0002	100	DNA polymerase III subunit beta (DnaN)	3	27	C	DNA replication, recombination, modification and repair
PAK_03560	PA1787	100	Aconitate hydratase 2 (AcnB)	2	26	C/OMV	Energy metabolism
PAK_02336	PA2862	99,7	Lactonizing lipase (LipA)	2	26	OM/E	Carbon compound catabolism-Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)
PAK_00720	PA0505	98,7	Uncharacterized protein	2	26	U	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_01512	PA3675	100	Uncharacterized protein	2	26	U	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_00262	PA0044	98,9	ADP-ribosyltransferase (ExoT)	2	25	E/HA	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)
PAK_00509	PA0299	100	Aminotransferase (SpuC)	2	25	C	Putative enzymes-Carbon compound catabolism
PAK_02590	PA2709	100	Cysteine synthase (CysK)	3	25	C	Amino acid biosynthesis and metabolism
PAK_00493	PA0283	100	ABC transporter permease (Sbp)	3	24	P	Transport of small molecules
PAK_03765	PA1586	100	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (SucB)	2	24	C/OMV	Energy metabolism
PAK_05176	PA4687	99,4	Ferric iron-binding periplasmic protein (HitA)	2	24	P	Transport of small molecules
PAK_00758	PA0542	100	Uncharacterized protein	2	23	U	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_05144	PA4671	99,5	50S ribosomal protein L25 (RplY)	2	22	C/OMV	Adaptation, Protection-Translation, post-translational modification, degradation
PAK_040459	PA0459	99,4	Clp protease (ClpC)	2	22	C	Translation, post-translational

00674							modification, degradation
PAK_00660	PA0446	100	CoA-transferase	2	22	C	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_02113	PA3083	99,9	Aminopeptidase N (PepN)	3	21	C	Translation, post-translational modification, degradation
PAK_00257	PA0041	90,4	Hemagglutinin	3	21	OM/E	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)
Y880_01078_75	PA3790	100	TonB-dependent receptor	3	21	OM/OMV	Transport of small molecules
PAK_05241	PA4745	100	Transcription termination/antitermination protein (NusA)	2	21	C/OMV	Transcription, RNA processing and degradation
PAK_02243	PA2952	100	Electron transfer flavoprotein subunit beta (EtfB)	2	20	U/OMV	Energy metabolism
PAK_02129	PA3068	99,8	NAD-glutamate dehydrogenase (GdhB)	2	20	C/OMV	Amino acid biosynthesis and metabolism
PAK_05681	PA5171	99,5	Arginine deiminase (ArcA)	2	19	C/OMV	Amino acid biosynthesis and metabolism
PAK_05755	PA5243	99,4	Delta-aminolevulinic acid dehydratase (HemB)	3	19	C	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers
PAK_02729	PA2575	100	Nitroreductase	3	19	U	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_03509	PA1830	100	SCP-2 family sterol carrier protein	3	19	U	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_05644	PA5138	100	ABC amino acid transporter periplasmic component	2	18	U	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_05788	PA5274	100	Nucleoside diphosphate kinase regulator	2	18	C	Transcriptional regulators
PAK_01972	PA3224	100	3-phosphoglycerate kinase	3	17	U	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_04554	PA0833	100	Cell envelope biogenesis protein OmpA (OmpA)	2	17	OM/OMV	Membrane proteins
PAK_00724	PA0509	100	C-type cytochrome (NirN)	2	17	P/MLS	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers-Energy metabolism
PAK_03326	PA2008	100	Fumarylacetoacetase (FahA)	2	17	C	Carbon compound catabolism
PAK_00561	PA0347	99,5	Glycerophosphodiester phosphodiesterase	2	17	P	Fatty acid and phospholipid metabolism
PAK_02860	PA2445	99,6	Glycine dehydrogenase (decarboxylating) (GcvP)	2	17	C	Central intermediary metabolism-Amino acid biosynthesis and metabolism
PAK_04962	PA4501	96,7	Porin (OdpP)	2	17	OM	Transport of small molecules-Membrane proteins
PAK_01117	PA4061	100	Thioredoxin	2	17	C	Energy metabolism
PAK_01360	PA3819	100	Uncharacterized protein	2	17	U	Membrane proteins
PAK_05054	PA4587	99,7	Cytochrome C peroxidase (CcpR)	2	16	P	Energy metabolism
PAK_05119	PA5119	100	Glutamine synthetase	2	16	C/OMV	Amino acid biosynthesis and

05625			(GlnA)				metabolism
PAK_04080	PA1287	99,5	Glutathione peroxidase	2	16	P	Putative enzymes
PAK_00762	PA0546	99,8	S-adenosylmethionine synthase (MetK)	2	16	C	Amino acid biosynthesis and metabolism-Central intermediary metabolism
PAK_02038	ausente		Uncharacterized protein	2	16		-
PAK_05583	PA5076	100	ABC transporter substrate-binding protein	2	15	P	Transport of small molecules
PAK_01155	PA4022	100	Aldehyde dehydrogenase (HdhA)	2	15	C/OMV	Putative enzymes
PAK_01313	PA3865	99,2	Amino acid ABC transporter	2	15	P	Transport of small molecules
PAK_00071	PA5435	100	Oxaloacetate decarboxylase alpha subunit	3	15	C	Central intermediary metabolism
PAK_00241	PA0026	100	Phospholipase (PlcB)	2	15	E	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_01570	PA3617	100	Protein (RecA)	2	15	C/OMV	DNA replication, recombination, modification and repair
PAK_01501	PA3686	100	Adenylate kinase (Adk)	2	14	C	Nucleotide biosynthesis and metabolism
PAK_04944	PA4483	100	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A (GatA)	3	14	C/P	Translation, post-translational modification, degradation
PAK_04959	PA4498	99,8	Metallopeptidase	2	14	C	Translation, post-translational modification, degradation
PAK_00118	PA5481	99,3	Uncharacterized protein	2	14	P	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_04300	PA1082	100	Flagellar basal body rod protein (FlgG)	2	13	E/F	Cell wall / LPS / capsule-Motility & Attachment
PAK_03919	PA1441	99,1	Flagellar hook-length control protein (FliK)	2	13	P	Hypothetical, unclassified, unknown-Motility & Attachment
PAK_01146	PA4031	100	Inorganic pyrophosphatase (Ppa)	2	13	C	Central intermediary metabolism
PAK_00255	PA0039	100	Uncharacterized protein	2	13	U	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_01618	PA3569	100	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	2	12	C	Carbon compound catabolism
PAK_01189	PA3987	100	Leucine--tRNA ligase (LeuS)	2	12	C	Amino acid biosynthesis and metabolism-Translation, post-translational modification, degradation
PAK_02812	PA2498	100	Ankyrin	2	11	U	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_04204	PA1166	98,5	Dienelactone hydrolase	2	11	U	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_01552	PA3635	100	Enolase (Eno)	2	11	C	Translation, post-translational modification, degradation-Carbon compound catabolism-Energy metabolism
PAK_	PA1784	100	Lyase	3	11	U	Hypothetical, unclassified,

03563							unknown
PAK_04329	PA1053	100	Membrane protein	2	11	OM/OMV	Membrane proteins
PAK_00475	PA0265	100	Succinate-semialdehyde dehydrogenase (GabD)	2	11	C	Central intermediary -Carbon compound catabolism-Amino acid biosynthesis and metabolism
PAK_04521	PA0865	100	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (Hpd)	2	10	C	Amino acid biosynthesis and metabolism
PAK_03790	PA1562	100	Aconitate hydratase (AcnA)	2	10	C	Energy metabolism
PAK_03063	PA2249	99,8	Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit E2 (BdkB)	2	10	C	Amino acid biosynthesis and metabolism
PAK_01495	PA3692	100	Membrane protein (LptF)	2	10	OM/OMV	Membrane proteins-Transport of small molecules
PAK_00860	ausente		Uncharacterized protein	2	10		
PAK_01453	PA3734	99,7	Uncharacterized protein	2	10	CM	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_05819	PA5303	100	Uncharacterized protein	3	10	U	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_05261	PA4764	100	Ferric uptake regulation protein	2	9	C	Transcriptional regulators
Y880_01240_00	ausente		Phage tail protein	2	9		-
PAK_04924	PA4463	100	Ribosomal subunit interface protein	2	9	C	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_02685	PA2616	99,7	Thioredoxin reductase	2	9	C/U/MLS	Nucleotide biosynthesis and metabolism
PAK_03650	PA1698	100	Type III secretion protein (PopN)	2	9	OM/E	Membrane proteins-Protein secretion/export apparatus
PAK_00881	PA0668	99,8	Tyrosine--tRNA ligase (TyrS)	2	9	C	Amino acid biosynthesis and metabolism-Translation, post-translational modification, degradation
PAK_04229	PA1139	99,3	Uncharacterized protein	2	9	P	Hypothetical, unclassified, unknown
Y880_01072_80	PA3684	99,1	Uncharacterized protein	2	9	U	Hypothetical, unclassified, unknown
PAK_02033	ausente		3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	2	8		
PAK_02076	PA2117	100	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase (Asd)	2	7	C	Amino acid biosynthesis and metabolism
PAK_00625	PA0409	100	Chemotaxis protein (CheY)	2	7	C	Two-component regulatory systems-Chemotaxis-Motility & Attachment
PAK_05774	PA5260	99,4	Porphobilinogen deaminase (HemC)	2	7	C	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers
PAK_00764	PA0548	100	Transketolase (TktA)	2	7	C	Energy metabolism
PAK_05016	PA5016	99,8	Acetyltransferase	2	6	C/OMV	Carbon compound catabolism-

05523			component of pyruvate dehydrogenase complex (AceF)				Energy metabolism
PAK_02029	PA3168	100	DNA gyrase subunit A (GyrA)	2	6	C	DNA replication, recombination, modification and repair
PAK_01176	PA4001	100	Lytic transglycosylase (sltB1)	2	5	CM	Cell wall / LPS / capsule
PAK_02029	PA3134	99,6	Glutamate--tRNA ligase (GltX)	2	4	C	Translation, post-translational modification, degradation

Se consideraron aquellas proteínas presentes en al menos 2 de 3 réplicas de la cepa WT y ausentes en PDE⁺.

^a Las búsquedas fueron realizadas utilizando una base de datos de la cepa PAK. Se realizó una comparación de secuencias (*Pseudomonas database blast*) para identificar el gen en la cepa PA01.

^b La anotación de la proteína se obtiene de la búsqueda en base de datos de la cepa PAK y en caso de no existir, de su homólogo en PA01.

^c señal total corresponde con la sumatoria del número de espectros asignados a cada proteína en las distintas réplicas y es una medida de su abundancia relativa.

^d En el caso de algunas proteínas el flagelo que carecen de homólogas en PA01, la localización corresponde a la reportada en PAK..

†La localización se reportó de acuerdo a la base de datos *Pseudomonas database* C: Citoplasmática; CM: Membrana citoplasmática; OMV: Vesículas de membrana externa; OM: Membrana externa; U: Indeterminada; MLS: Múltiples sitios de localización; P: Periplásmica; E: extracelular; F: Flagelo.

Tabla 14. **Proteínas identificadas exclusivamente en la fracción de exoproteínas de la cepa PDE⁺ en análisis proteómicos de tipo *shotgun*.**

Gen en PAK	Gen en PA01 ^a	% de homología	Proteína identificada ^b	Nº de réplicas	Señal total ^c	Localización [†]	<i>PseudoCAP function</i>
PAK_05095	PA4625	99,1	Hemagglutinin (Fragment) (CdrA)	3	220	E	Hypothetical, unclassified, unknown-Cell wall / LPS / capsule-Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)
PAK_02229	PA2966	100	Acyl carrier protein (AcpP)	2	38	C	Fatty acid and phospholipid metabolism
PAK_01065	PA4110	99,2	Beta-lactamase (AmpC)	3	38	P	Adaptation, Protection
PAK_05094	PA4625	100	Uncharacterized protein	2	33	E	Hypothetical, unclassified, unknown-Cell wall / LPS / capsule-Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)
PAK_00670	PA0456	100	Cold-shock protein	2	32	C	Transcriptional regulators-Adaptation, Protection
PAK_00900	PA4271	100	50S ribosomal protein L7/L12 (RplL)	2	27	C	Translation, post-translational modification, degradation
PAK_04825	P4366	100	Superoxide dismutase (SdoB)	2	27	P	Adaptation, Protection
PAK_	PA4932	100	50S ribosomal protein L9	2	15	C	Translation, post-translational

05435			(RplI)				modification, degradation
PAK_05259	PA4762	100	Protein (GrpE)	2	14	C	DNA replication, recombination, modification and repair-Chaperones & heat shock proteins
PAK_04438	PA0943	100	Dehydrogenase	2	13	P	Hypothetical, unclassified, unknown-Protein secretion/export apparatus
PAK_05252	PA4755	100	Transcription elongation factor (GreA)	2	12	C	Transcription, RNA processing and degradation
PAK_01444	PA3742	100	50S ribosomal protein L19 (RplS)	2	11	C	Translation, post-translational modification, degradation
PAK_02859	PA2446	100	Glycine cleavage system H protein (GcvH)	2	11	C	Amino acid biosynthesis and metabolism
Y880_01027_75	PA2853	100	Lipoprotein (OprL)	3	10	OM/OM V	Membrane proteins
PAK_05558	PA5051	99,8	Arginine--tRNA ligase (ArgS)	2	5	C	Translation, post-translational modification, degradation

Se consideraron aquellas proteínas presentes en al menos 2 de 3 réplicas de la cepa PDE⁺ y ausentes en WT.

^a Las búsquedas fueron realizadas utilizando una base de datos de la cepa PAK. Se realizó una comparación de secuencias (*Pseudomonas database blast*) para identificar el gen en la cepa PAO1.

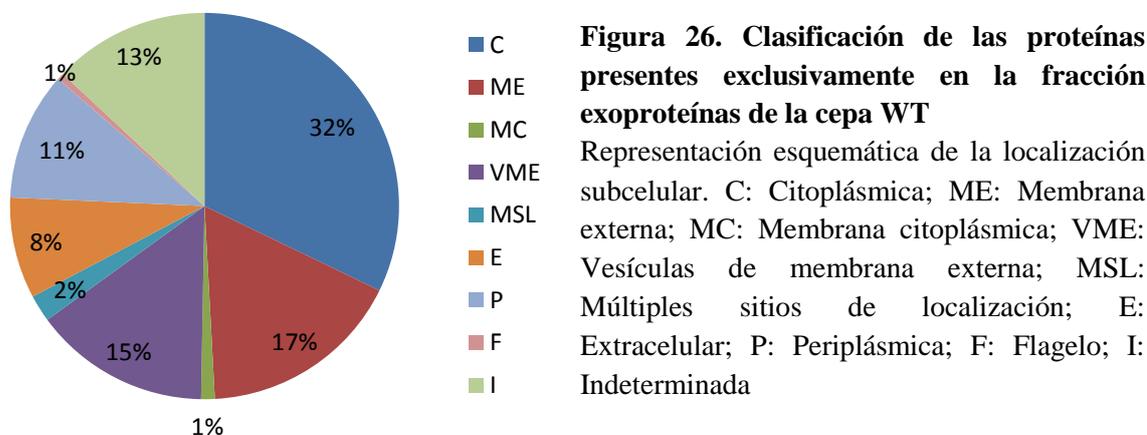
^b La anotación de la proteína se obtiene de la búsqueda en base de datos de la cepa PAK y en caso de no existir, de su homólogo en PAO1.

^c señal total corresponde con la sumatoria del número de espectros asignados a cada proteína en las distintas réplicas y es una medida de su abundancia relativa.

†La localización se reportó de acuerdo a la base de datos *Pseudomonas database*: C: Citoplasmática; CM: Membrana citoplasmática; OMV: Vesículas de membrana externa; OM: Membrana externa; U: Indeterminada; MLS: Múltiples sitios de localización; P: Periplásmica; E: extracelular; F: Flagelo.

De las proteínas que sólo están presentes en la cepa WT, las que presentan mayor señal total corresponden a *A-type flagellin* (señal total 1649) y *A-type flagellar hook associated protein* (señal total 1152). Consistentemente, ambas proteínas fueron identificadas en varios *spots* diferenciales en el experimento de 2D DIGE, donde se encontraron subrepresentadas en la cepa PDE⁺. Utilizando la aproximación de tipo *shotgun* identificamos además en esta fracción otras proteínas adicionales del flagelo, que están solamente presentes en la cepa WT (FlgM, FlgE, FlgL, FlgK, FlgG, FliK). En conjunto estos resultados apuntan a que las proteínas del flagelo están muy disminuidas o ausentes en las fracciones analizadas de la cepa PDE⁺. Cabe destacar que para el caso de proteínas que desaparecen o cambian muy dramáticamente, la estrategia de DIGE tiende a subestimar la tasa de cambio debido a la señal de fondo presente en los geles.

Por otro lado, la proteína más abundante dentro de las presentes solamente en PDE⁺ es CdrA con una señal total de 220, en concordancia con lo observado para el DIGE de exoproteínas.



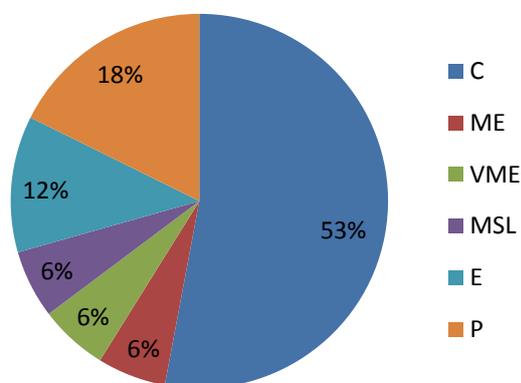
Otro dato que surge claramente del análisis de estas listas de proteínas diferenciales es la presencia de varias proteínas del SSTT, tanto del complejo translocador (PopN, PopB y PcrV) como de las exotoxinas (ExoS y ExoT), en la cepa WT pero no en la cepa PDE⁺.

Globalmente, a partir de los datos de localización subcelular se determinó que sólo el 24% de las proteínas identificadas como diferenciales son esperadas para la fracción de exoproteínas (8% corresponde a proteínas secretadas, el 1% a proteínas de flagelo y el 15% a proteínas de vesículas de membrana externa) mientras que el resto corresponde a una fracción diferente (32% citoplásmica; 13% indeterminada; 2% poseen múltiples sitios de localización; 11% periplásmicas; 17% de membrana externa 1% membrana interna). La distribución de las distintas localizaciones se observa en la figura 26.

En el caso de la cepa PDE⁺, se determinó que 12% corresponden a proteínas secretadas y un 6% a proteínas presentes en vesículas de membrana externa, mientras que el resto corresponden a una fracción diferente (54% citoplásmicas; 6% poseen múltiples sitios de localización; 18% periplásmicas; 6% membrana externa). La distribución de las distintas localizaciones observadas se resume en la figura 27. Cabe destacar que, tanto para el caso de PDE⁺ como para WT, la mayoría de las proteínas diferencialmente representadas no corresponden a exoproteínas. Sin embargo, en ambas cepas las proteínas mayoritarias identificadas son proteínas secretadas o proteínas que se han encontrado en vesículas de membrana externa y que por lo tanto se espera encontrar en esta fracción.

Figura 27. Clasificación de las proteínas presentes exclusivamente en la fracción de membrana de la cepa PDE⁺

Representación esquemática de la localización subcelular. . C: Citoplásmica; ME: Membrana externa; VME: Vesículas de membrana externa; MSL: Múltiples sitios de localización; E: Extracelular; P: Periplásmica.

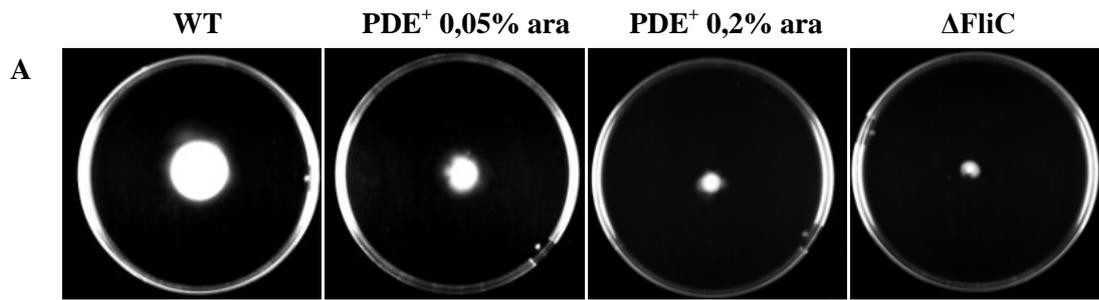


3. Análisis de motilidad de la cepa PDE⁺

El análisis proteómico comparativo de las cepas WT y PDE⁺ reveló que múltiples proteínas implicadas en la quimiotaxis y ensamblaje de flagelo poseen su expresión reducida en la cepa PDE⁺. Dado que además los principales blancos de regulación por quimiotaxis son el flagelo y el pili tipo IV, y que estos constituyen las principales estructuras adhesivas y de motilidad *P. aeruginosa*, caracterizamos dichas estructuras mediante diversos enfoques con el fin de validar los resultados proteómicos.

3.1-La síntesis de proteínas del flagelo se ve reducida en la cepa PDE⁺

Los resultados proteómicos apuntan a que las proteínas estructurales de flagelo se ven muy afectadas por la sobreexpresión de la proteína PA2133. Con el fin de validar dichos resultados se realizaron ensayos de movilidad dependiente de flagelo en LB suplementado con 0,3% de agar según se explicó en materiales y métodos (O'Toole & Kolter 1998b). Brevemente, se inoculó una colonia en el centro de las placas y luego de 24 hs se comparó el halo de avance en las distintas condiciones evaluadas. Como control negativo de movilidad se utilizó la cepa Δ FliC. La figura 28A muestra imágenes representativas de las placas. Los resultados obtenidos indican que la movilidad dependiente de flagelo de la cepa PDE⁺ se ve seriamente comprometida. Al igual que otros fenotipos analizados en el transcurso de este trabajo, esta disminución es dependiente de los niveles de expresión de PA2133. La cuantificación de la movilidad se llevó a cabo a través de la determinación del área de los halos de avance como se explicó en materiales y métodos. Los datos fueron normalizados respecto a WT, y además se restó el área del control negativo (Δ FliC). Como se muestra en el gráfico de la figura 28B, la cepa PDE⁺ suplementada con 0,05% de L-arabinosa presenta una reducción del 77% de la movilidad respecto a la cepa WT, mientras que en la cepa suplementada con 0,2% esta reducción es de un 96%. Éstas diferencias resultan estadísticamente significativas por test de ANOVA ($p < 0.05$) y test de Tukey ($q < 0.05$).



B

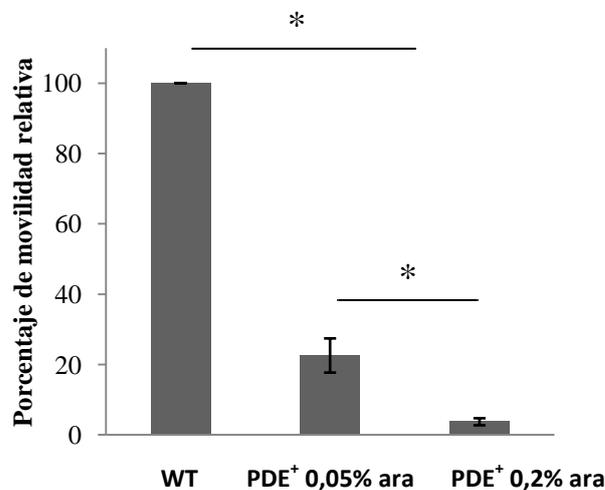


Figura 28. Efecto de la sobreexpresión de la proteína PA2133 sobre la movilidad dependiente de flagelo.

A-Imágenes de las placas de movilidad dependiente de flagelo donde se observan los halos de avance para las cepas WT, PDE⁺ suplementado con 0,05 y 0,2% de L-arabinosa y ΔFliC.

B-Cuantificación del efecto observado en A por determinación del área de halos de avance utilizando el programa Image J y el diámetro de placa como longitud conocida para la calibración.

Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas por ANOVA ($p < 0,05$) y Test de Tukey ($q < 0,05$).

Debido a que los ensayos de movilidad hablan sobre la funcionalidad del flagelo pero no son concluyentes en cuanto a la presencia del mismo, se llevaron a cabo dos aproximaciones diferentes para evaluar la presencia del flagelo. Por un lado se observaron las bacterias por microscopía electrónica de transmisión, y por otro se llevaron a cabo extracciones de flagelo siguiendo protocolos reportados previamente.

La figura 29A muestra imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión para las cepas WT, PDE⁺ suplementada con 0,2% de L-arabinosa, ΔFliC y ΔPilA, teñidas negativamente. Las flechas sólidas indican el flagelo y las discontinuas los pili tipo IV. La barra de escala representa 500 nm. En el caso de la cepa PDE⁺ no se encontró ninguna bacteria flagelada.

Para confirmar esta observación se realizaron extracciones de flagelo para las cepas en estudio. Los extractos generados se analizaron en geles de SDS PAGE, como se muestra en la figura 29B. En el caso de la cepa WT se observa una banda prominente de masa molecular aparente de 66 kDa, que fue identificada por espectrometría de masa de tipo MALDI-TOF/TOF como *Type A flagellin*, la principal subunidad estructural del flagelo en *P. aeruginosa*. Para esta proteína se obtuvo una cobertura de secuencia de 31%, con 10 péptidos asignados y un *Mascot protein score* de 133. En el caso de la cepa PDE⁺ (0,2% L-arabinosa) no se observa una banda clara a la misma altura del gel, y lo mismo se observa en el caso de la cepa Δ FliC. Estos resultados en su conjunto apuntan a que la cepa PDE⁺ tiene un defecto en la síntesis y/o ensamblaje del flagelo, lo que resulta en una cepa mayoritariamente sin flagelo.

Con el fin de determinar si la reducción en los niveles de flagelo se debe a una disminución en su síntesis o su ensamblaje, se analizó un extracto total de bacterias mediante Western Blot, utilizando un anticuerpo anti-FliC, y la cepa Δ FliC como control negativo (figura 29C). El mismo reveló que mientras que en la cepa WT se observa una banda clara correspondiente a flagelina, los niveles de esta proteína en las cepas PDE⁺ y Δ FliC son indetectables por este método. Estos resultados confirman que la sobreexpresión de la proteína PA2133 afecta, ya sea de forma directa o indirecta, la síntesis de flagelina, la proteína estructural del filamento del flagelo.

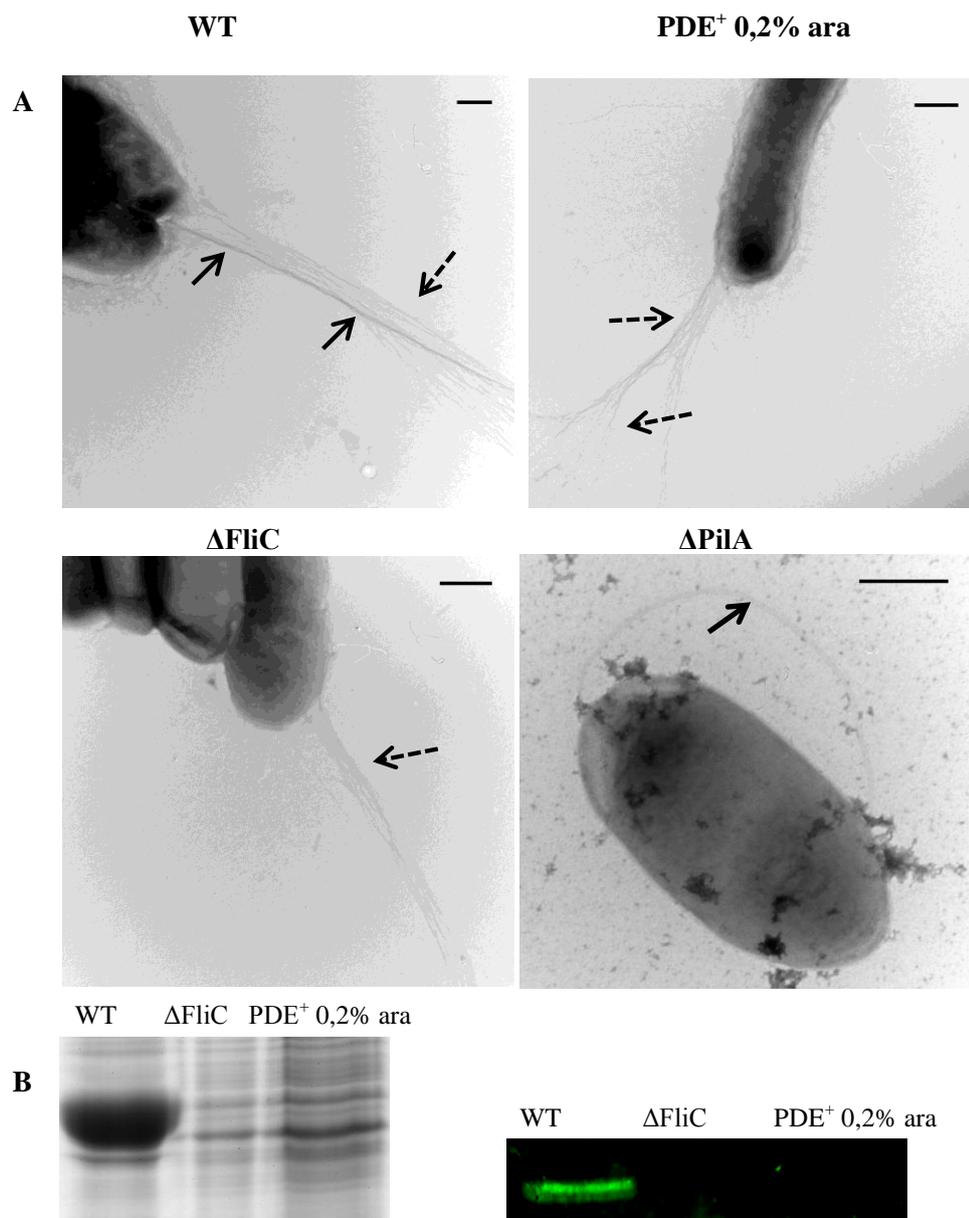


Figura 29. Efecto de la sobreexpresión de PA2133 sobre el ensamblaje de flagelo.

A- Micrografías electrónicas de las cepas PDE⁺, ΔFliC, WT y ΔPilA. Las flechas sólidas indican el flagelo y las punteadas el pili tipo IV. La barra de escala representa 500 nm.

B-Análisis mediante SDS PAGE de las proteínas obtenidas en la extracción de flagelo. La banda más abundante obtenida en la cepa WT fue analizada por espectrometría de masa de tipo MALDI/TOF-TOF y se identificó a la proteína flagelina tipo A

C-Western blot de un lisado total de bacterias separado por SDS PAGE, revelado con un anticuerpo anti-FliC. Como control negativo se usaron extractos de la cepa ΔFliC.

3.2-La funcionalidad del pili tipo IV se ve afectada en la cepa PDE⁺

Los estudios proteómicos realizados revelaron que proteínas involucradas en la funcionalidad del pili son diferenciales entre la cepas WT y PDE⁺. Una de las principales proteínas sobrerrepresentada en la cepa PDE⁺, la histidina quinasa ChpA, está directamente involucrada en la quimiotaxis mediada por pili tipo IV (Whitchurch et al 2004). Adicionalmente, FimV que participa en el ensamblaje de esta estructura, se detectó claramente con dos isoformas diferentes, una predominante en la cepa WT y otra en la cepa PDE⁺. Si bien durante la observación de las muestras por microscopía electrónica de transmisión fue posible ver que la cepa PDE⁺ posee pili tipo IV, nos propusimos profundizar en la comparación de esta estructura entre ambas cepas a nivel estructural y funcional. Para ello, en primer lugar se llevó a cabo una extracción de dicha estructura en las cepas WT, PDE⁺ y Δ PilA, tal como se explicó en materiales y métodos. Los extractos de pili tipo IV se separaron mediante SDS PAGE y las bandas más abundantes se analizaron por espectrometría de masa MALDI-TOF/TOF. La figura 30 muestra un gel representativo, donde se observa que las cepas WT y PDE⁺ poseen una banda abundante y que la misma está ausente en la cepa Δ PilA. El análisis por espectrometría de masa permitió identificar a la proteína PilA, la principal proteína estructural del pili tipo IV, como el componente mayoritario de estas bandas. Para la cepa WT se obtuvo una cobertura de secuencia de 77%, un *Mascot protein score* de 322 y 10 péptidos asignados a la secuencia de PilA, la principal subunidad estructural del pili tipo IV. Para la cepa PDE⁺ la cobertura de secuencia fue de 44%, el *Mascot protein score* fue de 266 y se asignaron 5 péptidos a la secuencia de PilA.

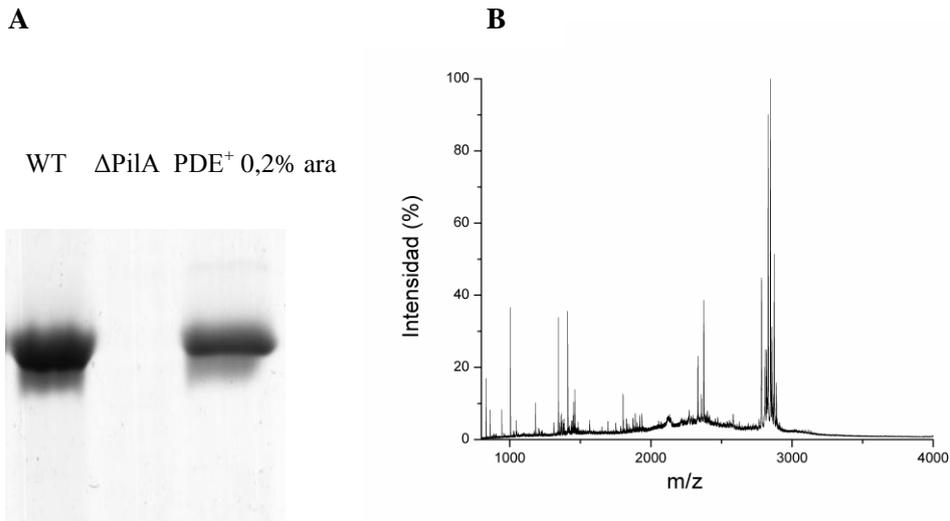


Figura 30. Análisis de las proteínas presentes en las extracciones de pili tipo IV

A- Imagen de un gel SDS PAGE donde se separaron las proteínas presentes en la extracción de pili tipo IV.

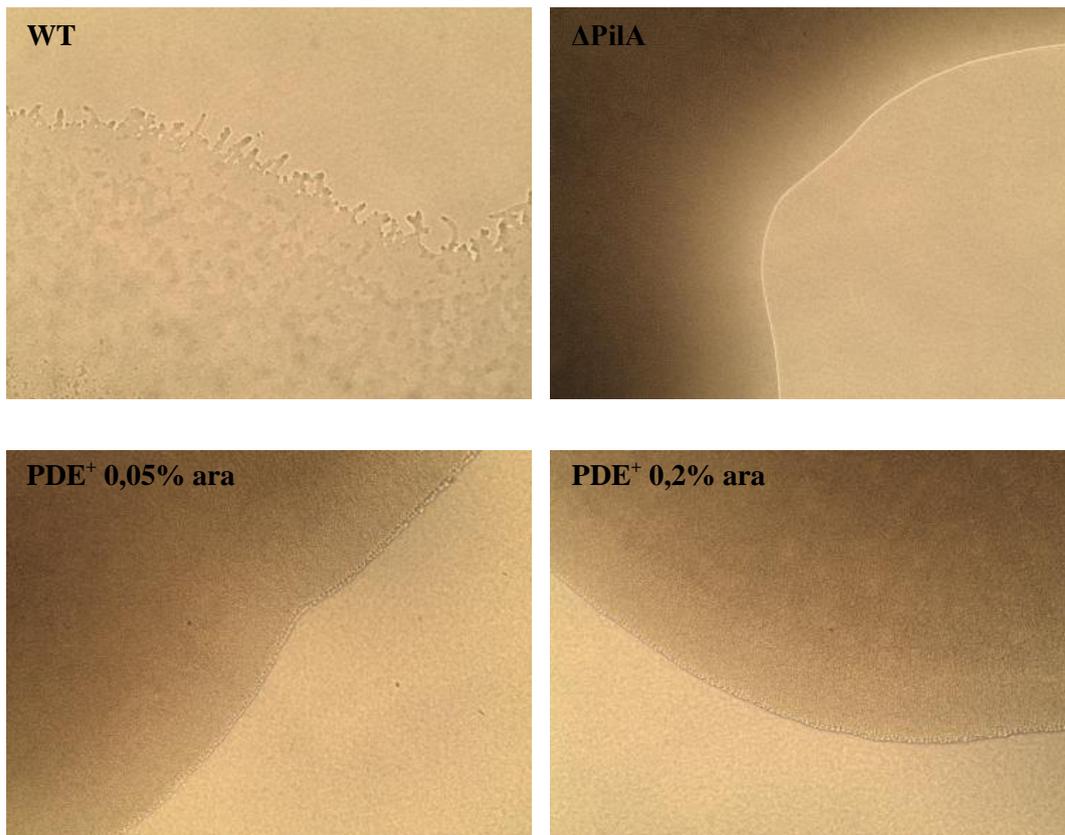
B- Espectro resultante de la banda de la cepa PDE+ suplementada con 0,2% de L-arabinosa. Las bandas mayoritarias en las cepas WT y PDE+ fueron analizadas por espectrometría de masa de tipo MALDI/TOF-TOF y se identificó a la proteína pilina.

Si bien estos resultados concuerdan con lo observado en la microscopía, no son concluyentes en cuanto a funcionalidad del pili. Un indicador de la funcionalidad del pili tipo IV es el reborde de colonia. La figura 31A muestra imágenes representativas de los rebordes de colonia para las cepas WT, Δ PilA, y PDE⁺ suplementado con 0,2% o 0,05% de L-arabinosa. En las cepas en las que el pili está ausente (Δ PilA), el reborde de la colonia es recortado. En comparación, la cepa WT que posee un pili funcional presenta un reborde ramificado, en donde es posible observar frentes de migración superpuestos. En el caso de la cepa PDE⁺, el fenotipo es intermedio entre ambos casos: el reborde no se observa ramificado ni recortado, sino dentado. A diferencia del resto de los fenotipos reportados en este trabajo, no existe diferencia observable en el borde de colonia de las cepas inducidas con distintos niveles de arabinosa. Estos resultados sugieren un posible defecto en la movilidad sobre superficies sólidas de la cepa que sobreexpresa la proteína PA2133.

Con el fin de complementar el análisis funcional del pili tipo IV, se llevaron a cabo ensayos de movilidad dependiente de pili IV (Whitchurch et al 1991). El principio de este ensayo es similar al de movilidad dependiente de flagelo, sólo que a diferencia de éste se permite a las bacterias colonizar la interfase plástico-agar, y además se utiliza

una mayor concentración de agar (1% vs 0,3%). La figura 31B muestra imágenes representativas del ensayo de movilidad dependiente de pili junto con un gráfico de cuantificación de áreas (figura 31C). Las áreas se normalizaron respecto a la condición WT y además se restó el promedio del área para la cepa Δ PilA. Se observa que la migración para la cepa PDE⁺ es menor que para WT. Según test de ANOVA ($p < 0.05$) y test de Tukey ($q < 0.05$) dicha diferencia es significativa. Sin embargo, en concordancia a lo observado para los rebordes de colonia, no se observa una dependencia de comportamiento con los niveles de L-arabinosa, es decir, la suplementación con distintos niveles no genera un cambio estadísticamente significativo. En conjunto estos resultados sugieren que la funcionalidad del pili tipo IV se ve afectada en la cepa PDE⁺, pero que el umbral de di-GMPc necesario para regular este fenotipo es diferente al requerido para los otros fenotipos analizados en este trabajo, incluyendo la movilidad dependiente del flagelo, la formación de biofilms, y la producción de EPS.

A



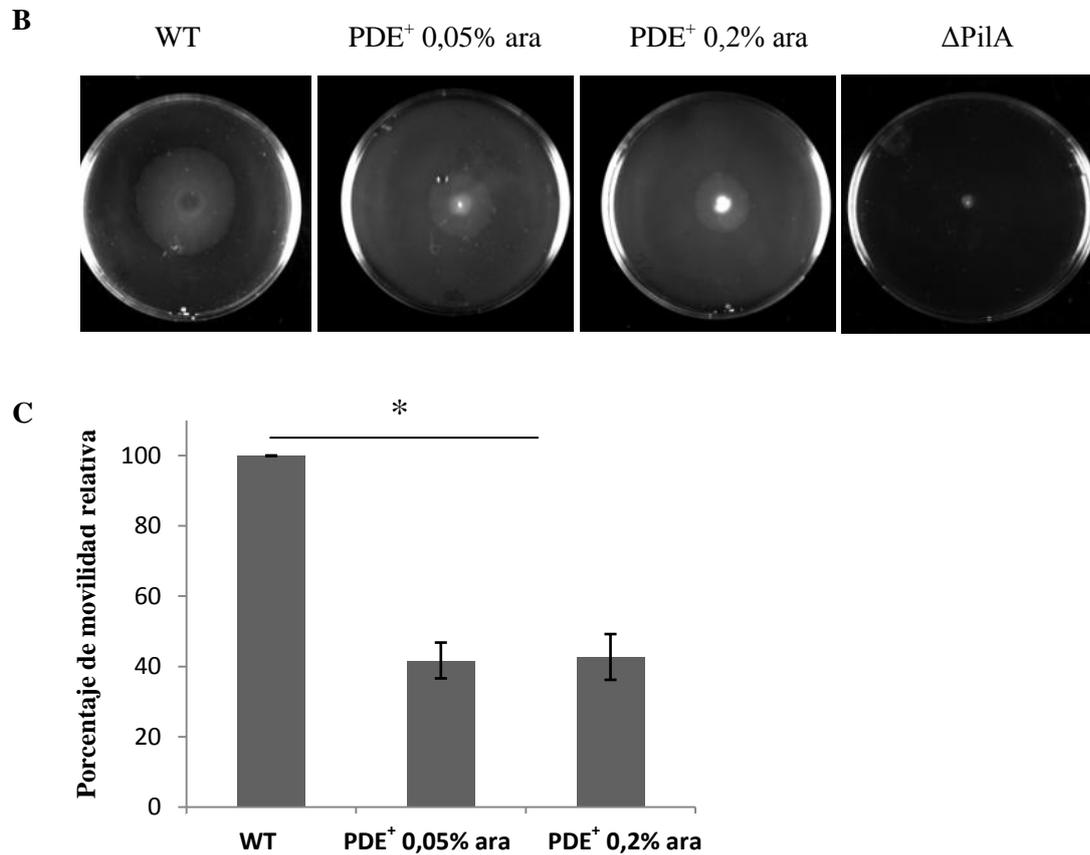


Figura 31. Efecto de la sobreexpresión de la proteína PA2133 sobre la funcionalidad del pili tipo IV.

A- Comparación de los rebordes de colonia para las cepas WT, PDE⁺ (0,2 y 0,05% L-arabinosa) y ΔPilA.

B-Imágenes de las placas movilidad dependiente de pili tipo IV donde se observa el halo de avance para las cepas WT, PDE⁺ suplementada con 0,05 o 0,2% de arabinosa y ΔPilA .

C-Cuantificación del efecto observado en B por determinación del área de halos de avance utilizando el programa Image J y el diámetro de placa como longitud conocida para la calibración.

Las diferencias estadísticamente significativas por ANOVA ($p < 0,05$) y test de Tukey ($q < 0,05$) se indican con un asterisco.

VI-DISCUSIÓN

En este trabajo, se caracterizó una cepa que sobreexpresa la fosfodiesterasa PA2133 desde el punto de vista fenotípico y proteómico. El análisis comparativo de las cepas WT y PDE⁺ permitió identificar 4 aspectos claves de la fisiología y de la patogénesis de *P. aeruginosa* que se ven afectados por la sobreexpresión de la proteína PA2133: La adhesión a superficies bióticas y abióticas, la citotoxicidad, la expresión de receptores de quimiotaxis y la movilidad dependiente de pili y flagelo. Mientras que muchos de los resultados obtenidos son esperados para cepas con bajos niveles de di-GMPc, otros están en contraposición con el modelo actual y por tanto cuestionan nuestro entendimiento sobre la regulación mediada por este segundo mensajero.

Citotoxicidad

Reportes previos indican que la sobreexpresión de la proteína PA2133 genera una cepa con baja citotoxicidad dependiente del SSTT en células CHO (Kulasakara et al 2006). Estos autores infectaron células CHO con *P. aeruginosa* WT y una cepa que sobreexpresa la fosfodiesterasa PA2133 y evaluaron la liberación de lactato deshidrogenasa al medio extracelular. Niveles altos de lactato deshidrogenasa en el medio se correlacionan con estrés celular elevado como consecuencia de la inyección de toxinas.

El SSTT es un sistema esencial en la translocación de proteínas del flagelo al exterior, así como en la translocación de toxinas al citoplasma de células eucariotas (Abby & Rocha 2012, Blocker et al 2003). El SSTT que transloca toxinas al hospedero representa el SSTT no-flagelar o inyectorio, y cuando en la literatura se hace referencia al mismo se le denomina simplemente SSTT.

El análisis proteómico reveló que varias proteínas pertenecientes al SSTT, tanto del translocador como algunas exotoxinas, están presentes en la cepa WT pero no en la cepa PDE⁺.

Nuestro análisis reveló que 2 toxinas del SSTT (ExoS y ExoT), así como 4 componentes estructurales del translocador (PopN, PopB, PopD y PcrV), se encuentran presentes en la fracción de exoproteínas de la cepa WT pero no se detectaron en la cepa PDE⁺. En este mismo sentido, la proteína que forma la secretina inserta en la membrana externa a través de la cual pasan los componentes estructurales del SSTT y las exotoxinas (PscC) no se detectó en la fracción de membrana de la cepa PDE⁺ pero sí en

la cepa WT. Si bien se ha reportado que la translocación de las toxinas se induce por el contacto con la célula hospedera, también se ha visto que existe una secreción basal de los mismos al medio extracelular (Sundin et al 2004).

Por otra parte, y en este mismo sentido, la exotoxina A (ToxA o ExoA), uno de los factores extracelulares de virulencia mas importante en *P. aeruginosa* no se pudo detectar en la cepa PDE⁺ pero si en la WT. La exotoxina A es una ADP-ribosil-transferasa similar a la toxina colérica, que inhibe irreversiblemente la síntesis de proteínas en eucariotas y cuya secreción no se da a través del SSTT sino que se da a través de la vía general de secreción GSP (del inglés, *General secretion pathway*). (Iglewski & Kabat 1975, Lory et al 1983, McVay & Hamood 1995).

En conjunto nuestros resultados apuntan a que la cepa PDE⁺ posee una virulencia atenuada y que la síntesis del SSTT está regulada por los niveles de di-GMPc. Este resultado es novedoso, ya que a nuestro conocimiento es la primera vez que se observa una regulación negativa de la síntesis de componentes del SSTT en respuesta a bajos niveles de di-GMPc. En *D. dadantii*, se observó que la eliminación del genoma de dos enzimas con actividad fosfodiesterasa, EcpB y EcpC, inhibe la transcripción de proteínas del SSTT (Yi et al 2010). Por otra parte, para la cepa PA14 de *P. aeruginosa*, se observó que la expresión del SSTT es inhibida por altos niveles de di-GMPc (Moscoso et al 2011) y la secreción de ExoS se inhibe por la eliminación del genoma de una enzima con actividad PDE (Ryan et al 2009). A pesar de que nuestros resultados son opuestos a las observaciones realizadas por otros grupos de trabajo, cabe destacar que el fenotipo observado por Kulesakara para la citotoxicidad de la cepa que sobreexpresa la proteína PA2133, es consistente con nuestros resultados. Esto refleja una vez más que la regulación por di-GMPc es más compleja de lo inicialmente pensado y que cada enzima con actividad PDE o DGC juega un rol diferente independientemente de los niveles globales de di-GMPc.

Adhesión a superficies bióticas y abióticas.

En este trabajo se evaluó la capacidad de adhesión a la superficie epitelial de la cepa PDE⁺, utilizando como modelo de epitelio células MDCK polarizadas. Según nuestros resultados la capacidad de adhesión de la cepa PDE⁺ se encuentra severamente afectada. Algunos resultados proteómicos podrían explicar, al menos parcialmente, este fenotipo. Una de las conclusiones más claras que surgen utilizando distintas aproximaciones proteómicas es que la sobreexpresión de PA2133 provoca una disminución muy

importante en los niveles expresión de proteínas del flagelo, una de las principales estructuras de movilidad y adhesión en *P. aeruginosa* (Drake & Montie 1988, O'Toole & Kolter 1998a). En particular, utilizando la estrategia de *shotgun* 12 proteínas de esta estructura (*A type flagellin*, FleQ, FlgE, FlgG, FlgI, FlgK FlgL, FlgM, FliF, FliK MotB y *Type A associated flagellar hook*) fueron detectadas en la cepa WT, pero no se pudieron detectar o se encontraron subrepresentadas en PDE⁺. En particular, la proteína *A type flagellin* fue detectada como diferencial tanto en la fracción de membrana como exoproteínas. En forma consistente, las proteínas *A Type flagellin* y *Type A associated flagellar hook* fueron detectadas como diferenciales utilizando la estrategia de 2D-DIGE. Este resultado es muy llamativo, ya que como se comentó brevemente en la sección anterior, el flagelo es secretado a través del SSTT flagelar. El inyectisoma (que transloca toxinas al citoplasma del hospedero) y el flagelo poseen una organización estructural similar y se cree que el SSTT no-flagelar evolucionó a partir del SSTT flagelar ya que el primero sólo se encuentra en bacterias Gram-negativas y el segundo tanto en Gram-negativas como Gram-positivas (Abby & Rocha 2012, Blocker et al 2003). En *Salmonella*, el factor σ^{28} , que regula la transcripción de los genes del flagelo también regula la transcripción del SSTT no flagelar (Eichelberg & Galan 2000, Galan 1999). En *P. aeruginosa* un factor que participa de esta regulación es RpoN (σ^N) (Matz et al 2008, Totten et al 1990). Si bien este factor no fue detectado como proteína diferencial en nuestros análisis proteómicos, los mismos no estuvieron enfocados en la detección de proteínas citosólicas. Sin embargo, en base a nuestros resultados es posible postular que los niveles de di-GMPc podrían regular la síntesis de proteínas de estas dos estructuras a través de un factor σ común. Es interesante notar que no encontramos en la literatura reportes de una regulación negativa de la síntesis de proteínas del flagelo y el SSTT en respuesta a bajos niveles de di-GMPc. Curiosamente, los proteomas de las cepas WT y PDE⁺ presentan diferencias en varias proteínas con actividad histidina quinasa. Si bien para la mayoría de ellas no se conoce exactamente la función en *P. aeruginosa*, son candidatos que podrían analizarse como posibles mediadores de estos efectos, a través de la fosforilación de los reguladores de respuesta asociados.

Curiosamente, dos proteínas relacionadas con la adhesión y formación de biofilms se identificaron como sobrerrepresentadas en PDE⁺: CdrA y su transportador, CdrB. Reportes de la literatura indican que CdrA se encuentra principalmente bajo dos isoformas, una de 150 kDa que es secretada al medio y otra de 220 kDa que se ha

encontrado asociada a la célula. La isoforma de 220 kDa posee un dominio N-terminal de unión a carbohidratos (aminoácidos 45-153) seguido de un dominio hemaglutinina (aminoácidos 332-477) (Borlee et al 2010). El análisis por espectrometría de masa no nos permitió identificar péptidos en la región N-terminal de la proteína, a pesar de que los péptidos generados por digestión trípica de este segmento poseen múltiples masas pasibles de ser observadas en el rango m/z seleccionado. El primer aminoácido detectado para CdrA fue la metionina 388. Esto sugiere que en la isoforma detectada por nosotros el dominio de unión a carbohidratos se encuentra ausente y el dominio hemaglutinina probablemente está interrumpido. Dado que el dominio de unión a carbohidratos está implicado en el entrecruzamiento de los carbohidratos presentes en la matriz celular así como en la superficie de la bacteria e incluso en la superficie del hospedero, la presencia de esta adhesina en la fracción de exoproteínas de la cepa PDE⁺ es consistente con la falta de adhesión observada a lo largo de este trabajo para esta cepa. Sin embargo, este resultado pone en evidencia una vez más que la sobreexpresión de la proteína PA2133 genera un fenotipo opuesto a lo reportado.

Según datos de la literatura, la expresión de los genes del sistema Pel y Cdr en la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* se activa en respuesta a la sobreexpresión de la diguanilato ciclasa WspR y por tanto en respuesta a altos niveles de di-GMPc (Borlee et al 2010, Hickman & Harwood 2008). FleQ es represor de estos dos operones y a su vez es el principal activador transcripcional de genes del flagelo. En respuesta a altos niveles de di-GMPc, FleQ se disocia de sus sitios de unión al ADN eliminando la represión en la transcripción de los operones sistemas Pel y Cdr y la activación de los genes del flagelo. (Arora et al 1997, Borlee et al 2010, Hickman & Harwood 2008, Hickman et al 2005). Globalmente nuestros resultados muestran el cambio de todas estas proteínas en forma muy consistente entre ellas, pero asociados a bajos niveles de di-GMPc: FleQ, así como los componentes estructurales y regulatorios del flagelo se encuentran entre las proteínas subrepresentadas en la cepa PDE⁺ mientras que CdrA y CdrB (al igual que PelB y PelC) se encuentran sobrerrepresentadas. Nuestros resultados apuntan a que las vías de regulación mediadas por di-GMPc son muy complejas y que los cambios encontrados a nivel de proteínas por sobreexpresión de una guanilato ciclasa o fosfodiesterasa específica no son extrapolables a otras proteínas con la misma actividad.

En conclusión, la capacidad de la cepa PDE⁺ de asociarse a superficies tanto bióticas como abióticas está severamente afectada en la cepa PDE⁺. Más aún, la disminución en

la capacidad de formación de estructuras multicelulares es dependiente de los niveles de expresión de la proteína PA2133. Estos resultados son los esperados para cepas con bajos niveles de di-GMPc; el efecto de este segundo mensajero sobre la formación de estas estructuras ha sido extensamente estudiado y reportado (Barraud et al 2009, Jimenez-Fernandez et al 2015, Merritt et al 2007, Newell et al 2011). En particular, nuestros resultados corroboran observaciones previas para el caso de la fosfodiesterasa en estudio (Hickman et al 2005, Kulasakara et al 2006). En concordancia con estos resultados hemos observado que la producción de exopolisacárido, principal componente de la matriz polimérica extracelular que da soporte estructural al biofilm, se encuentra disminuida en la cepa PDE⁺.

Los estudios proteómicos nos permitieron identificar cambios en proteínas relacionadas a la adhesión y producción de exopolisacárido entre ambas cepas. En particular el análisis proteómico por *shotgun* permitió demostrar que la cepa PDE⁺ posee mayor representación de algunos genes del sistema Pel (PelB y PelC) respecto a la cepa WT, mientras que el activador transcripcional de los genes de síntesis de alginato, AlgR (Lizewski et al 2002) sólo se detectó en la cepa WT.

En *P. aeruginosa* la matriz de exopolisacárido está compuesta por alginato, carbohidratos tipo Pel (ricos en glucosa) y carbohidratos tipo Psl (ricos en manosa) (Friedman & Kolter 2004, Ghafoor et al 2011, Liang 2015).

PelB y PelC son proteínas codificadas en un operón regulado por di-GMPc y que participan en la exportación de carbohidratos ricos en glucosa que forman parte del EPS (Hickman et al 2005, Vasseur et al 2007). Los datos que obtuvimos mediante el ensayo de incorporación del colorante rojo Congo en las colonias de la cepa PDE⁺ apuntan a que la síntesis global de carbohidratos que forman parte del exopolisacárido está disminuida. El rojo Congo ha sido ampliamente utilizado para determinar la capacidad de síntesis de exopolisacárido, sin embargo su especificidad por los distintos componentes del mismo no ha sido determinada. Si bien nuestros resultados apuntan a que la síntesis de carbohidratos de tipo Pel esté aumentada en la cepa PDE⁺, creemos que la falta de AlgR en esta cepa produce una disminución abrupta en los niveles de alginato y como consecuencia una deficiencia en la incorporación del rojo Congo.

Por tanto, nuestros resultados apuntan a que el defecto en la adhesión de la cepa PDE⁺ puede estar mediado a través de la presencia de una adhesina inactiva y/o por la inhibición en la síntesis de componentes del flagelo.

Quimiotaxis

El análisis proteómico permitió identificar 17 receptores de quimiotaxis (MCPs) en la fracción de membrana de la cepa WT (Aer, CtpH, CttP, PctA, PctC, PstB, PA1465, PA1608, PA2652, PA2654, PA2788, PA2867, PA2920, PA3349, PA4633 y PA4915), los que además fueron detectados como proteínas relativamente abundantes en esa fracción. En la cepa PDE⁺ no se pudieron detectar 16 de estos receptores y uno de ellos se detectó subrepresentado en forma estadísticamente significativa (PctB). En *P. aeruginosa* existen 26 MCPs, de las cuales sólo aproximadamente la mitad han sido caracterizadas (Kato et al 2008). De estas 17 proteínas sólo se conoce la función de 7 de ellas. PctA, PctB y PctC participan en la quimiotaxis positiva hacia 19 aminoácidos y en la quimiotaxis negativa en presencia de altas concentraciones de cloroetileno, un residuo industrial que es contaminante común de las aguas subterráneas (Kato et al 2008, Reyes-Darias et al 2015, Shitashiro et al 2005, Taguchi et al 1997). En oposición, CttP participa en la quimiotaxis positiva hacia bajas concentraciones de este compuesto, ya que en estas condiciones es capaz de degradarlo (Parales & Harwood 2002). Aer es el receptor de quimiotaxis hacia el oxígeno (Hong et al 2004), mientras que PstB y CtpH poseen un rol demostrado en la quimiotaxis hacia fosfato inorgánico (Nikata et al 1996, Wu et al 2000). Cabe destacar que de los 17 MCPs cuya expresión se ve afectada en la cepa PDE⁺, 13 fueron identificados como proteínas capaces de unir di-GMPc en un estudio proteómico (Duvel et al 2012). Si bien el rol de esta interacción aún no ha sido caracterizado, en la bacteria *A. brasilense*, se observó que el receptor de aerotaxis promueve la motilidad en respuesta a niveles elevados de di-GMPc, pero que si estos niveles se mantienen por tiempos prolongados se suprime la motilidad y se promueve la agregación (Russell et al 2013).

Por otro lado, hemos identificado como diferencial, a una proteína reguladora que participa la quimiotaxis dependiente de pili tipo IV (ChpA). La misma fue identificada solamente en la fracción de membrana de la cepa PDE⁺. ChpA es una proteína de señalización muy compleja que posee actividad histidina quinasa, un dominio de tipo CheY y mediante diversos algoritmos informáticos se predice que además tiene un dominio de tipo CheW. De esta manera, ChpA centralizaría la función de varias de las proteínas del sistema Che en una sola proteína (Leech & Mattick 2006, Whitchurch et al 2004). ChpA se ha visto implicada en la biogénesis del pili tipo IV y su funcionalidad, a través del control de ensamblaje y su retracción respectivamente (Bertrand et al 2010,

Leech & Mattick 2006, Whitchurch et al 2004). Reportes recientes indican que ChpA ejerce su efecto sobre el pili tipo IV en parte a través de la regulación indirecta de los niveles del segundo mensajero AMPc (Fulcher et al 2010). Por otra parte, se ha visto que ChpA es capaz de unir di-GMPc, pero aun no se conoce el efecto que desencadena esta unión (Duvel et al 2012).

Los resultados obtenidos indican que la cepa PDE⁺ presenta una fuerte reducción en el número de receptores de quimiotaxis en su membrana. De los 26 MCPs existentes en *P. aeruginosa*, sólo uno de ellos, PilJ, se ha visto implicado en la quimiotaxis dependiente de pili tipo IV y el resto estarían involucrados en la movilidad dependiente de flagelo (Kato et al 2008, Sampedro et al 2015). Ya que PilJ no fue detectada mediante la estrategia de *shotgun*, no es posible determinar si su expresión se ve disminuida en la cepa PDE⁺. Todos los MCPs cuya expresión se observó afectada en dicha cepa, han sido reportados como receptores de quimiotaxis asociados al flagelo, estructura que a su vez posee expresión severamente disminuida en la cepa PDE⁺ (Sampedro et al 2015). En este contexto, consideramos que la realización de ensayos de quimiotaxis dependientes tanto de pili como de flagelo para la cepa PDE⁺ sería poco informativa.

Movilidad

Los resultados obtenidos a partir de análisis tanto proteómicos y de microscopía, así como estudios funcionales de movilidad, permitieron demostrar en forma muy contundente que la sobreexpresión de la fosfodiesterasa PA2133 inhibe la síntesis de los componentes del flagelo y como consecuencia se genera una cepa con un grave defecto en la movilidad. Este fenotipo, como ya se discutió anteriormente, está en contraposición con lo esperado de acuerdo a nuestro conocimiento actual, donde bajos niveles de di-GMPc se asocian a cepas hipermóviles en distintas bacterias (Aragon et al 2015, Merritt et al 2007, Tan et al 2014).

En el caso del pili tipo IV, la otra estructura de movilidad de *P. aeruginosa*, el análisis proteómico no permitió concluir que la expresión de proteínas de dicha estructura se vea afectada en la cepa PDE⁺. Múltiples proteínas estructurales del complejo pili tipo IV (PilA, PilC, PilN, PilP, PilQ, PilX y PilY1) se detectaron en el grupo de proteínas cuyos niveles son similares en ambas cepas en la fracción de proteínas de membrana (datos no mostrados). Sin embargo, tanto el análisis de la fracción de proteínas de membrana

insolubles en buffer 2D, como el análisis de tipo *shotgun* indican que algunas proteínas implicadas en la regulación de la movilidad dependiente de pili, o bien poseen niveles alterados en la cepa PDE⁺ (ChpA, FimL) o la isoforma predominante en esta cepa es distinta a la predominante en WT (FimV). Si bien el análisis de las extracciones de esta estructura parece indicar una subrepresentación leve de la misma en la cepa PDE⁺, a partir de estos ensayos sólo se puede obtener información semicuantitativa. A diferencia de los ensayos de extracción de flagelo, en los que se utilizan cultivos líquidos, en estos ensayos las bacterias se recobran de placas de LB agar mediante el uso de un rastrillo (la adhesión a superficie promueve la expresión de pili tipo IV). Esto dificulta relativizar las cantidades de pilina (la proteína mayoritaria del filamento del pili) recuperada ya que una diferencia mínima al rastrillar puede generar la diferencia observada. El análisis por microscopía electrónica concuerda con el análisis de los extractos de pili tipo IV en cuanto a la presencia de esta estructura en la cepa PDE⁺. A pesar de lo expuesto, y en concordancia con los patrones de representación observados para ChpA, FimL y FimV en ambas cepas, los rebordes de colonia sugieren que la funcionalidad del pili tipo IV se ve afectada en la cepa PDE⁺. Este efecto fue confirmado a través de los ensayos de movilidad. A diferencia del resto de los fenotipos evaluados en este trabajo, la disminución en la movilidad no es dependiente de los niveles de L-arabinosa ensayados. Cabe destacar que aunque no se muestra en este trabajo, se evaluó una concentración de L-arabinosa aún menor (0,02%) sin observar un aumento en la movilidad como ocurre para la movilidad dependiente de flagelo. Esto indicaría, que el pili tipo IV está regulado por di-GMPc, pero a un valor umbral de concentración y/o un mecanismo de acción diferente. Si bien el efecto de la sobreexpresión de la proteína PA2133 sobre la movilidad es inesperado, el mismo ha sido validado utilizando distintas aproximaciones desde la microscopía a la proteómica y por tanto pensamos que es un resultado muy robusto.

Integración de resultados

En resumen, la sobreexpresión de la fosfodiesterasa PA2133 afecta principalmente 4 procesos en la bacteria. Éstos procesos son la citotoxicidad mediada por el sistema de secreción tipo III, la adhesión a superficies bióticas y abióticas, la expresión de receptores de quimiotaxis y la movilidad. En particular, la ausencia de flagelo está directa o indirectamente relacionada a los cuatro procesos o estructuras afectadas. A partir del análisis proteómico, puede observarse que el perfil de expresión de proteínas

en ambas cepas tiene algunas diferencias importantes. En este sentido se identificaron dos reguladores de la transcripción que podrían estar mediando los cambios observados: Vfr y FleQ.

Vfr y FleQ son dos reguladores de la transcripción centrales a todos los cambios proteómicos observados, y ambos se encontraron sobrerrepresentados en la fracción de membrana de la cepa WT. Ambas proteínas han sido reportadas como capaces de unir di-GMPc a pesar de no contener dominios clásicos de unión a este nucleótido (Hickman & Harwood 2008). Más aún, la unión al ADN de ambos reguladores transcripcionales se ha visto inhibida por altos niveles de di-GMPc (Almblad et al 2015, Duvel et al 2012, Hickman & Harwood 2008, Leduc & Roberts 2009, Tao et al 2010).

Vfr es un activador transcripcional de alrededor de 200 genes, entre ellos se encuentran los pertenecientes al pili tipo IV, el sistema de secreción tipo III y la exotoxina A (Beatson et al 2002, Fuchs et al 2010, Wolfgang et al 2003). Por otro lado FleQ, es el principal activador transcripcional de los genes del flagelo y represor de los genes Pel y Cdr (Arora et al 1997, Borlee et al 2010, Hickman & Harwood 2008, Hickman et al 2005). Cabe destacar que si bien estos reguladores han sido identificados en forma consistente en una u otra cepa en la fracción de membrana, para corroborar la expresión alterada de los mismos sería necesario realizar estudios proteómicos sobre las fracciones citosólicas.

Para la mayor parte de los genes regulados por Vfr, la activación es dependiente de los niveles de AMPc (Almblad et al 2015, Fuchs et al 2010, Serate et al 2011). En este sentido, varias proteínas que aparecen sobrerrepresentadas en PDE⁺ se han visto involucradas en la regulación de los niveles de este segundo mensajero. La más destacada de ellas es ChpA, la segunda proteína diferencial con mayor sobrerrepresentación en la cepa PDE⁺, proteína cuyas características ya fueron detalladas previamente en esta discusión. Por otra parte y en este mismo sentido se encuentra FimL. FimL es una proteína homóloga a la región N-terminal de ChpA en la que están ausentes los residuos fosforilables, y que al igual que ChpA, se ha visto implicada en la regulación del pili tipo IV (Shan et al 2004, Whitchurch et al 2005). Tanto para ChpA como FimL se ha visto que la sobreexpresión trae como consecuencia una disminución abrupta en los niveles globales de AMPc por un mecanismo que involucra la regulación de la actividad adenilato ciclasa de CyaB, la principal enzima que cataliza la síntesis de AMPc en *P. aeruginosa* (Fulcher et al 2010, Inclan et al 2011). Resulta oportuno destacar que mediante nuestra aproximación, además de ChpA

y FimL detectamos como sobrerrepresentada en PDE⁺ una proteína que se encuentra anotada como adenilato ciclasa en la cepa PAK (PA5209 en PA01) y posee un dominio CYTH característico de esta familia de proteínas. Una posibilidad que necesitaría verificación experimental es que en la cepa PDE⁺ no sólo los niveles de di-GMPc se encuentran alterados, sino también los de AMPc.

La disminución en los niveles de estos dos reguladores transcripcionales, Vfr y FleQ, en la cepa PDE⁺ explicarían la pérdida en la expresión del sistema de secreción tipo III, la exotoxina A y la deficiencia en la movilidad dependiente de pili. En el mismo sentido la disminución de los niveles de FleQ sería responsable de que no se detecten proteínas del flagelo, y de la expresión aumentada de CdrA-B y PelB y PelC en dicha cepa. Sin embargo, los datos proteómicos revelan la presencia de un gran número de proteínas diferenciales. Entre estas se encuentran otros reguladores transcripcionales y elementos de señalización, los cuales podrían estar jugando un papel clave en la regulación de la expresión de las proteínas identificadas como diferenciales.

De acuerdo a nuestro conocimiento, es la primera vez que se observa una disminución en la expresión de los genes de flagelo, sistema de secreción tipo III y receptores de quimiotaxis como consecuencia de la sobreexpresión de una fosfodiesterasa de di-GMPc, así como una disminución en la movilidad dependiente de pili tipo IV.

En este sentido el principal resultado que surge de esta tesis es que, a través de la sobreexpresión de la proteína PA2133, fue posible disociar el efecto del di-GMPc sobre la movilidad y formación de biofilms. El modelo actual plantea que bajos niveles de di-GMPc se asocian a alta movilidad y baja capacidad de formación de biofilms. En el caso de la cepa PDE⁺ demostramos que la misma está asociada a baja movilidad y baja capacidad de formación de biofilms.

Recientemente se ha comenzado a postular que en realidad no son los niveles globales de di-GMPc sino mas bien, acumulaciones locales de este segundo mensajero las responsables de los fenotipos particulares observados. El genoma de *P. aeruginosa* codifica para alrededor de 40 proteínas con dominios implicados en la síntesis o degradación de di-GMPc (GGDEF, HD-GYP y EAL). Sin embargo, en el caso del segundo mensajero AMPc, para el que la regulación se da a través de la existencia de un cúmulo global, sólo se han identificado dos proteínas implicadas en su síntesis (CyaA y CyaB) y una en su degradación (CpdA). Esto apoya fuertemente la idea de que no todas las enzimas con dominios PDE o DGC poseen el mismo rol biológico y que la

distribución de di-GMPc en la célula posee un patrón insular. En este mismo sentido, existe un reporte que apunta a que no existe una correlación directa entre los niveles globales de di-GMPc y fenotipos específicos. En ese trabajo se analizaron dos cepas deficientes en distintas DGCs (Δ RoeA y Δ SadC). Si bien ambas cepas poseen iguales niveles de di-GMPc las mismas presentan fenotipos muy distintos en lo que respecta a movilidad y síntesis de EPS (Merritt et al 2010).

Alternativamente, el fenotipo observado podría deberse a que los niveles de di-GMPc en la cepa PDE⁺ son muy bajos, aun con la menor concentración de inductor utilizada. En apoyo a esta hipótesis existen dos reportes de la literatura en los que se generaron cepas de otras bacterias con niveles cero de di-GMPc y se realizaron observaciones similares a las encontradas durante este trabajo (Abel et al 2013, Solano et al 2009).

En el primero de ellos se construyó una cepa de *Salmonella* en la que se eliminaron todos los genes que codifican enzimas con dominios GGDEF (Solano et al 2009). En el otro se generó una cepa de *Caulobacter crescentus* en la que se eliminaron todos los genes que codifican proteínas con actividad DGC y PDE (Abel et al 2013). Al igual que ocurre con PDE⁺, estas cepas poseen tasas de replicación normales, son deficientes en la formación de biofilms, síntesis de exopolisacárido y poseen reducida su capacidad de adhesión a superficies, fenotipos normalmente asociados a cepas con bajos niveles de di-GMPc. Sin embargo, estas cepas presentan baja citotoxicidad y son deficientes en el ensamblaje de flagelo (Abel et al 2013, Solano et al 2009). Estos resultados cuestionan fuertemente el modelo actual, y permiten sugerir que los niveles muy bajos y muy altos de di-GMPc generarían fenotipos similares en lo que respecta a la movilidad pero fenotipos diferenciales en cuanto a la formación de biofilms. En este sentido sería interesante poder llevar a cabo una regulación más fina de la inducción del gen *PA2133* de manera de ver si se observa el aumento inicial de la movilidad predicho por la literatura y luego una disminución de la misma a medida que los niveles de di-GMPc son más bajos.

En conjunto, los resultados obtenidos podrían contribuir a un mejor conocimiento de las vías mediadas por di-GMPc y que participan en el control de procesos esenciales para el establecimiento de la infección y virulencia de este patógeno oportunista.

VII-BIBLIOGRAFÍA

- Abby SS, Rocha EP. 2012. The non-flagellar type III secretion system evolved from the bacterial flagellum and diversified into host-cell adapted systems. *PLoS genetics* 8: e1002983
- Abel S, Bucher T, Nicollier M, Hug I, Kaefer V, et al. 2013. Bi-modal distribution of the second messenger c-di-GMP controls cell fate and asymmetry during the caulobacter cell cycle. *PLoS genetics* 9: e1003744
- Aebersold R, Goodlett DR. 2001. Mass spectrometry in proteomics. *Chemical reviews* 101: 269-95
- Almblad H, Harrison JJ, Rybtke M, Groizeleau J, Givskov M, et al. 2015. The Cyclic AMP-Vfr Signaling Pathway in *Pseudomonas aeruginosa* Is Inhibited by Cyclic Di-GMP. *Journal of bacteriology* 197: 2190-200
- Amikam D, Galperin MY. 2006. PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* 22: 3-6
- Annesley TM. 2003. Ion suppression in mass spectrometry. *Clinical chemistry* 49: 1041-4
- Aragon IM, Perez-Mendoza D, Gallegos MT, Ramos C. 2015. The c-di-GMP phosphodiesterase BifA is involved in the virulence of bacteria from the *Pseudomonas syringae* complex. *Molecular plant pathology* 16: 604-15
- Arora SK, Dasgupta N, Lory S, Ramphal R. 2000. Identification of two distinct types of flagellar cap proteins, FliD, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity* 68: 1474-9
- Arora SK, Ritchings BW, Almira EC, Lory S, Ramphal R. 1997. A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *Journal of bacteriology* 179: 5574-81
- Baldwin MA. 2004. Protein identification by mass spectrometry: issues to be considered. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 3: 1-9
- Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B. 2007. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and bioanalytical chemistry* 389: 1017-31
- Barraud N, Schleheck D, Klebensberger J, Webb JS, Hassett DJ, et al. 2009. Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal. *Journal of bacteriology* 191: 7333-42
- Beatson SA, Whitchurch CB, Sargent JL, Levesque RC, Mattick JS. 2002. Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 184: 3605-13
- Bertrand JJ, West JT, Engel JN. 2010. Genetic analysis of the regulation of type IV pilus function by the Chp chemosensory system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 192: 994-1010
- Beyhan S, Tischler AD, Camilli A, Yildiz FH. 2006. Transcriptome and phenotypic responses of *Vibrio cholerae* to increased cyclic di-GMP level. *Journal of bacteriology* 188: 3600-13
- Blocker A, Komoriya K, Aizawa S. 2003. Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 3027-30

- Bobrov AG, Kirillina O, Ryjenkov DA, Waters CM, Price PA, et al. 2011. Systematic analysis of cyclic di-GMP signalling enzymes and their role in biofilm formation and virulence in *Yersinia pestis*. *Molecular microbiology* 79: 533-51
- Borlee BR, Goldman AD, Murakami K, Samudrala R, Wozniak DJ, Parsek MR. 2010. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Molecular microbiology* 75: 827-42
- Brimer CD, Montie TC. 1998. Cloning and comparison of fliC genes and identification of glycosylation in the flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* a-type strains. *Journal of bacteriology* 180: 3209-17
- Bucior I, Mostov K, Engel JN. 2010. *Pseudomonas aeruginosa*-mediated damage requires distinct receptors at the apical and basolateral surfaces of the polarized epithelium. *Infection and immunity* 78: 939-53
- Burrows LL. 2012. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annual review of microbiology* 66: 493-520
- Carvalho PC, Fischer JS, Xu T, Cociorva D, Balbuena TS, et al. 2012. Search engine processor: Filtering and organizing peptide spectrum matches. *Proteomics* 12: 944-9
- Costello CE. 1999. Bioanalytic applications of mass spectrometry. *Current opinion in biotechnology* 10: 22-8
- Cramer R, Westermeier R. 2012. *Difference gel electrophoresis (DIGE) : methods and protocols*. New York: Humana Press : Springer. xiii, 401 p. pp.
- Croft L, Beatson SA, Whitchurch CB, Huang B, Blakeley RL, Mattick JS. 2000. An interactive web-based *Pseudomonas aeruginosa* genome database: discovery of new genes, pathways and structures. *Microbiology* 146 (Pt 10): 2351-64
- Chin KH, Lee YC, Tu ZL, Chen CH, Tseng YH, et al. 2010. The cAMP receptor-like protein CLP is a novel c-di-GMP receptor linking cell-cell signaling to virulence gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Journal of molecular biology* 396: 646-62
- Drake D, Montie TC. 1988. Flagella, motility and invasive virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of general microbiology* 134: 43-52
- Duvel J, Bertinetti D, Moller S, Schwede F, Morr M, et al. 2012. A chemical proteomics approach to identify c-di-GMP binding proteins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of microbiological methods* 88: 229-36
- Eichelberg K, Galan JE. 2000. The flagellar sigma factor FliA (sigma(28)) regulates the expression of *Salmonella* genes associated with the centisome 63 type III secretion system. *Infection and immunity* 68: 2735-43
- Engel JN. 2003. *Molecular pathogenesis of acute Pseudomonas aeruginosa infections. Severe Infections Caused by Pseudomonas aeruginosa*. pp. 201-230. New York: Kluwer Academic/Plenum Press.
- Fazli M, O'Connell A, Nilsson M, Niehaus K, Dow JM, et al. 2011. The CRP/FNR family protein Bcam1349 is a c-di-GMP effector that regulates biofilm formation in the respiratory pathogen *Burkholderia cenocepacia*. *Molecular microbiology* 82: 327-41
- Feldman M, Bryan R, Rajan S, Scheffler L, Brunnert S, et al. 1998. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infection and immunity* 66: 43-51
- Feltman H, Schulert G, Khan S, Jain M, Peterson L, Hauser AR. 2001. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 147: 2659-69

- Ferrandez A, Hawkins AC, Summerfield DT, Harwood CS. 2002. Cluster II che genes from *Pseudomonas aeruginosa* are required for an optimal chemotactic response. *Journal of bacteriology* 184: 4374-83
- Filloux A. 2012. *Bacterial Regulatory Networks*. pp. 123-142. UK: Caister academic press.
- Friedman L, Kolter R. 2004. Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Journal of bacteriology* 186: 4457-65
- Fuchs EL, Brutinel ED, Jones AK, Fulcher NB, Urbanowski ML, et al. 2010. The *Pseudomonas aeruginosa* Vfr regulator controls global virulence factor expression through cyclic AMP-dependent and -independent mechanisms. *Journal of bacteriology* 192: 3553-64
- Fujiki Y, Hubbard AL, Fowler S, Lazarow PB. 1982. Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology* 93: 97-102
- Fulcher NB, Holliday PM, Klem E, Cann MJ, Wolfgang MC. 2010. The *Pseudomonas aeruginosa* Chp chemosensory system regulates intracellular cAMP levels by modulating adenylate cyclase activity. *Molecular microbiology* 76: 889-904
- Galan JE. 1999. Interaction of Salmonella with host cells through the centisome 63 type III secretion system. *Current opinion in microbiology* 2: 46-50
- Galle M, Carpentier I, Beyaert R. 2012. Structure and function of the Type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current protein & peptide science* 13: 831-42
- Gensberg K, Smith AW, Brinkman FS, Hancock RE. 1999. Identification of oprG, a gene encoding a major outer membrane protein of *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 43: 607-8
- Gessard C. 1882. On the Blue and Green Coloration that Appears on Bandages. *Comptes rendus hebdomadaires des Seances de l'academie des Sciences* 94: 536/38
- Ghafoor A, Hay ID, Rehm BH. 2011. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Applied and environmental microbiology* 77: 5238-46
- Girgis HS, Liu Y, Ryu WS, Tavazoie S. 2007. A comprehensive genetic characterization of bacterial motility. *PLoS genetics* 3: 1644-60
- Godovac-Zimmermann J, Brown LR. 2001. Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. *Mass spectrometry reviews* 20: 1-57
- Harmsen M, Yang L, Pamp SJ, Tolker-Nielsen T. 2010. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS immunology and medical microbiology* 59: 253-68
- Hauser AR. 2009. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nature reviews. Microbiology* 7: 654-65
- He M, Ouyang Z, Troxell B, Xu H, Moh A, et al. 2011. Cyclic di-GMP is essential for the survival of the lyme disease spirochete in ticks. *PLoS pathogens* 7: e1002133
- Hengge R. 2009. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature reviews. Microbiology* 7: 263-73
- Hengge R. 2013. Novel tricks played by the second messenger c-di-GMP in bacterial biofilm formation. *The EMBO journal* 32: 322-3
- Hickman JW, Harwood CS. 2008. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Molecular microbiology* 69: 376-89

- Hickman JW, Tifrea DF, Harwood CS. 2005. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 14422-7
- Hong CS, Shitashiro M, Kuroda A, Ikeda T, Takiguchi N, et al. 2004. Chemotaxis proteins and transducers for aerotaxis in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology letters* 231: 247-52
- Iglewski BH, Kabat D. 1975. NAD-dependent inhibition of protein synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72: 2284-8
- Inclan YF, Huseby MJ, Engel JN. 2011. FimL regulates cAMP synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS one* 6: e15867
- Jenal U, Malone J. 2006. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annual review of genetics* 40: 385-407
- Jimenez-Fernandez A, Lopez-Sanchez A, Calero P, Govantes F. 2015. The c-di-GMP phosphodiesterase BifA regulates biofilm development in *Pseudomonas putida*. *Environmental microbiology reports* 7: 78-84
- Joseph NM, Sistla S, Dutta TK, Badhe AS, Parija SC. 2010. Ventilator-associated pneumonia: a review. *European journal of internal medicine* 21: 360-8
- Kader A, Simm R, Gerstel U, Morr M, Romling U. 2006. Hierarchical involvement of various GGDEF domain proteins in rdar morphotype development of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular microbiology* 60: 602-16
- Kato J, Kim HE, Takiguchi N, Kuroda A, Ohtake H. 2008. *Pseudomonas aeruginosa* as a model microorganism for investigation of chemotactic behaviors in ecosystem. *Journal of bioscience and bioengineering* 106: 1-7
- Kazmierczak BI, Jou TS, Mostov K, Engel JN. 2001. Rho GTPase activity modulates *Pseudomonas aeruginosa* internalization by epithelial cells. *Cellular microbiology* 3: 85-98
- Kearns DB. 2010. A field guide to bacterial swarming motility. *Nature reviews. Microbiology* 8: 634-44
- Kirillina O, Fetherston JD, Bobrov AG, Abney J, Perry RD. 2004. HmsP, a putative phosphodiesterase, and HmsT, a putative diguanylate cyclase, control Hms-dependent biofilm formation in *Yersinia pestis*. *Molecular microbiology* 54: 75-88
- Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jorgensen A, et al. 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular microbiology* 48: 1511-24
- Krasteva PV, Fong JC, Shikuma NJ, Beyhan S, Navarro MV, et al. 2010. *Vibrio cholerae* VpsT regulates matrix production and motility by directly sensing cyclic di-GMP. *Science* 327: 866-8
- Kuchma SL, Brothers KM, Merritt JH, Liberati NT, Ausubel FM, O'Toole GA. 2007. BifA, a cyclic-Di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of bacteriology* 189: 8165-78
- Kulasakara H, Lee V, Brencic A, Liberati N, Urbach J, et al. 2006. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 2839-44
- Kutsukake K, Ohya Y, Iino T. 1990. Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology* 172: 741-7

- Lasa I, Del Pozo JL, Penades JR, Leiva J. 2005. [Bacterial biofilms and infection]. *Anales del sistema sanitario de Navarra* 28: 163-75
- Leduc JL, Roberts GP. 2009. Cyclic di-GMP allosterically inhibits the CRP-like protein (Clp) of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Journal of bacteriology* 191: 7121-2
- Lee ER, Baker JL, Weinberg Z, Sudarsan N, Breaker RR. 2010. An allosteric self-splicing ribozyme triggered by a bacterial second messenger. *Science* 329: 845-8
- Leech AJ, Mattick JS. 2006. Effect of site-specific mutations in different phosphotransfer domains of the chemosensory protein ChpA on *Pseudomonas aeruginosa* motility. *Journal of bacteriology* 188: 8479-86
- Lepanto P, Bryant DM, Rossello J, Datta A, Mostov KE, Kierbel A. 2011. *Pseudomonas aeruginosa* interacts with epithelial cells rapidly forming aggregates that are internalized by a Lyn-dependent mechanism. *Cellular microbiology* 13: 1212-22
- Liang ZX. 2015. The expanding roles of c-di-GMP in the biosynthesis of exopolysaccharides and secondary metabolites. *Natural product reports* 32: 663-83
- Lim B, Beyhan S, Yildiz FH. 2007. Regulation of *Vibrio* polysaccharide synthesis and virulence factor production by CdgC, a GGDEF-EAL domain protein, in *Vibrio cholerae*. *Journal of bacteriology* 189: 717-29
- Liu H, Sadygov RG, Yates JR, 3rd. 2004. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in *shotgun* proteomics. *Analytical chemistry* 76: 4193-201
- Lizewski SE, Lundberg DS, Schurr MJ. 2002. The transcriptional regulator AlgR is essential for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infection and immunity* 70: 6083-93
- Lopez MJ, Cortes JA. 2012. [Urinary tract colonization and infection in critically ill patients]. *Medicina intensiva / Sociedad Espanola de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias* 36: 143-51
- Lory S, Tai PC, Davis BD. 1983. Mechanism of protein excretion by gram-negative bacteria: *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Journal of bacteriology* 156: 695-702
- Lundgren DH, Hwang SI, Wu L, Han DK. 2010. Role of spectral counting in quantitative proteomics. *Expert review of proteomics* 7: 39-53
- Macnab RM. 2003. How bacteria assemble flagella. *Annual review of microbiology* 57: 77-100
- Mandell GL, Bennett, J.E., Dolin, R. 2000. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York: Churchill Livingstone Inc.
- Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. 2001. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annual review of biochemistry* 70: 437-73
- Matthiesen R. 2007. *Mass spectrometry data analysis in proteomics*. Totowa, N.J.: Humana Press. x, 320 p. pp.
- Mattick JS. 2002. Type IV pili and twitching motility. *Annual review of microbiology* 56: 289-314
- Mattick JS, Bills MM, Anderson BJ, Dalrymple B, Mott MR, Egerton JR. 1987. Morphogenetic expression of *Bacteroides nodosus* fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 169: 33-41
- Matz C, Moreno AM, Alhede M, Manefield M, Hauser AR, et al. 2008. *Pseudomonas aeruginosa* uses type III secretion system to kill biofilm-associated amoebae. *The ISME journal* 2: 843-52

- McGrath EJ, Asmar BI. 2011. Nosocomial infections and multidrug-resistant bacterial organisms in the pediatric intensive care unit. *Indian journal of pediatrics* 78: 176-84
- McVay CS, Hamood AN. 1995. Toxin A secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: the role of the first 30 amino acids of the mature toxin. *Molecular & general genetics : MGG* 249: 515-25
- Merritt JH, Brothers KM, Kuchma SL, O'Toole GA. 2007. SadC reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function. *Journal of bacteriology* 189: 8154-64
- Merritt JH, Ha DG, Cowles KN, Lu W, Morales DK, et al. 2010. Specific control of *Pseudomonas aeruginosa* surface-associated behaviors by two c-di-GMP diguanylate cyclases. *mBio* 1
- Moscoso JA, Mikkelsen H, Heeb S, Williams P, Filloux A. 2011. The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches type III and type VI secretion via c-di-GMP signalling. *Environmental microbiology* 13: 3128-38
- Moyes RB, Reynolds J, Breakwell DP. 2009. Preliminary staining of bacteria: negative stain. *Current protocols in microbiology* Appendix 3: Appendix 3F
- Nakhamchik A, Wilde C, Rowe-Magnus DA. 2008. Cyclic-di-GMP regulates extracellular polysaccharide production, biofilm formation, and rugose colony development by *Vibrio vulnificus*. *Applied and environmental microbiology* 74: 4199-209
- Newell PD, Boyd CD, Sondermann H, O'Toole GA. 2011. A c-di-GMP effector system controls cell adhesion by inside-out signaling and surface protein cleavage. *PLoS biology* 9: e1000587
- Nikata T, Sakai Y, Shibata K, Kato J, Kuroda A, Ohtake H. 1996. Molecular analysis of the phosphate-specific transport (pst) operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular & general genetics : MGG* 250: 692-8
- O'Toole GA, Kolter R. 1998a. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular microbiology* 30: 295-304
- O'Toole GA, Kolter R. 1998b. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular microbiology* 28: 449-61
- Parales RE, Harwood CS. 2002. Bacterial chemotaxis to pollutants and plant-derived aromatic molecules. *Current opinion in microbiology* 5: 266-73
- Peng X, Xu C, Ren H, Lin X, Wu L, Wang S. 2005. Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of *Pseudomonas aeruginosa* responding to ampicillin, kanamycin, and tetracycline resistance. *Journal of proteome research* 4: 2257-65
- Ramos J-L. 2004. *Pseudomonas*. Boston: Kluwer Academic/Plenum. v. <1-4, 6> pp.
- Ramos JL, Levesque R.C. , ed. 2006. *Molecular Biology of Emerging Issues*, Vols. 4. España.
- Reyes-Darias JA, Yang Y, Sourjik V, Krell T. 2015. Correlation between signal input and output in PctA and PctB amino acid chemoreceptor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology* 96: 513-25
- Romling U, Galperin MY, Gomelsky M. 2013. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 77: 1-52

- Ross P, Weinhouse H, Aloni Y, Michaeli D, Weinberger-Ohana P, et al. 1987. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* 325: 279-81
- Russell MH, Bible AN, Fang X, Gooding JR, Campagna SR, et al. 2013. Integration of the second messenger c-di-GMP into the chemotactic signaling pathway. *mBio* 4: e00001-13
- Ryan RP, Fouhy Y, Lucey JF, Dow JM. 2006. Cyclic di-GMP signaling in bacteria: recent advances and new puzzles. *Journal of bacteriology* 188: 8327-34
- Ryan RP, Fouhy Y, Lucey JF, Jiang BL, He YQ, et al. 2007. Cyclic di-GMP signalling in the virulence and environmental adaptation of *Xanthomonas campestris*. *Molecular microbiology* 63: 429-42
- Ryan RP, Lucey J, O'Donovan K, McCarthy Y, Yang L, et al. 2009. HD-GYP domain proteins regulate biofilm formation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental microbiology* 11: 1126-36
- Ryjenkov DA, Simm R, Romling U, Gomelsky M. 2006. The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *The Journal of biological chemistry* 281: 30310-4
- Sampedro I, Parales RE, Krell T, Hill JE. 2015. *Pseudomonas* chemotaxis. *FEMS microbiology reviews* 39: 17-46
- Serate J, Roberts GP, Berg O, Youn H. 2011. Ligand responses of Vfr, the virulence factor regulator from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 193: 4859-68
- Shan Z, Xu H, Shi X, Yu Y, Yao H, et al. 2004. Identification of two new genes involved in twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 150: 2653-61
- Shapiro L. 1995. The bacterial flagellum: from genetic network to complex architecture. *Cell* 80: 525-7
- Shitashiro M, Tanaka H, Hong CS, Kuroda A, Takiguchi N, et al. 2005. Identification of chemosensory proteins for trichloroethylene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bioscience and bioengineering* 99: 396-402
- Simm R, Morr M, Kader A, Nimtz M, Romling U. 2004. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Molecular microbiology* 53: 1123-34
- Simm R, Morr M, Remminghorst U, Andersson M, Romling U. 2009. Quantitative determination of cyclic diguanosine monophosphate concentrations in nucleotide extracts of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Analytical biochemistry* 386: 53-8
- Solano C, Garcia B, Latasa C, Toledo-Arana A, Zorraquino V, et al. 2009. Genetic reductionist approach for dissecting individual roles of GGDEF proteins within the c-di-GMP signaling network in *Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 7997-8002
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, et al. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959-64
- Sudarsan N, Lee ER, Weinberg Z, Moy RH, Kim JN, et al. 2008. Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science* 321: 411-3
- Sultan SZ, Pitzer JE, Boquoi T, Hobbs G, Miller MR, Motaleb MA. 2011. Analysis of the HD-GYP domain cyclic dimeric GMP phosphodiesterase reveals a role in motility and the enzootic life cycle of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and immunity* 79: 3273-83

- Sundin C, Thelaus J, Broms JE, Forsberg A. 2004. Polarisation of type III translocation by *Pseudomonas aeruginosa* requires PcrG, PcrV and PopN. *Microbial pathogenesis* 37: 313-22
- Taguchi K, Fukutomi H, Kuroda A, Kato J, Ohtake H. 1997. Genetic identification of chemotactic transducers for amino acids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 143 (Pt 10): 3223-9
- Tan H, West JA, Ramsay JP, Monson RE, Griffin JL, et al. 2014. Comprehensive overexpression analysis of cyclic-di-GMP signalling proteins in the phytopathogen *Pectobacterium atrosepticum* reveals diverse effects on motility and virulence phenotypes. *Microbiology* 160: 1427-39
- Tao F, He YW, Wu DH, Swarup S, Zhang LH. 2010. The cyclic nucleotide monophosphate domain of *Xanthomonas campestris* global regulator Clp defines a new class of cyclic di-GMP effectors. *Journal of bacteriology* 192: 1020-9
- Thein M, Sauer G, Paramasivam N, Grin I, Linke D. 2010. Efficient subfractionation of gram-negative bacteria for proteomics studies. *Journal of proteome research* 9: 6135-47
- Thormann KM, Duttler S, Saville RM, Hyodo M, Shukla S, et al. 2006. Control of formation and cellular detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms by cyclic di-GMP. *Journal of bacteriology* 188: 2681-91
- Tischler AD, Camilli A. 2005. Cyclic diguanylate regulates *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infection and immunity* 73: 5873-82
- Toddard K. 2008. *Toddard's on line text book of bacteriology*. Capítulo 4 disponible en www.textbookofbacteriology.net.
- Totten PA, Lara JC, Lory S. 1990. The rpoN gene product of *Pseudomonas aeruginosa* is required for expression of diverse genes, including the flagellin gene. *Journal of bacteriology* 172: 389-96
- Totten PA, Lory S. 1990. Characterization of the type a flagellin gene from *Pseudomonas aeruginosa* PAK. *Journal of bacteriology* 172: 7188-99
- Tran CS, Rangel SM, Almblad H, Kierbel A, Givskov M, et al. 2014. The *Pseudomonas aeruginosa* type III translocon is required for biofilm formation at the epithelial barrier. *PLoS pathogens* 10: e1004479
- Trias J, Nikaido H. 1990. Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. *The Journal of biological chemistry* 265: 15680-4
- Vasseur P, Soscia C, Voulhoux R, Filloux A. 2007. PelC is a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane lipoprotein of the OMA family of proteins involved in exopolysaccharide transport. *Biochimie* 89: 903-15
- Wadhams GH, Armitage JP. 2004. Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 5: 1024-37
- Wehbi H, Portillo E, Harvey H, Shimkoff AE, Scheurwater EM, et al. 2011. The peptidoglycan-binding protein FimV promotes assembly of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus secretin. *Journal of bacteriology* 193: 540-50
- Whitchurch CB, Beatson SA, Comolli JC, Jakobsen T, Sargent JL, et al. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* fimL regulates multiple virulence functions by intersecting with Vfr-modulated pathways. *Molecular microbiology* 55: 1357-78
- Whitchurch CB, Hobbs M, Livingston SP, Krishnapillai V, Mattick JS. 1991. Characterisation of a *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility gene and evidence for a specialised protein export system widespread in eubacteria. *Gene* 101: 33-44

- Whitchurch CB, Leech AJ, Young MD, Kennedy D, Sargent JL, et al. 2004. Characterization of a complex chemosensory signal transduction system which controls twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology* 52: 873-93
- Wilhelm S, Gdynia A, Tielen P, Rosenau F, Jaeger KE. 2007. The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. *Journal of bacteriology* 189: 6695-703
- Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, et al. 1996. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Bio/technology* 14: 61-5
- Winsor GL, Lam DK, Fleming L, Lo R, Whiteside MD, et al. 2011. Pseudomonas Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for Pseudomonas genomes. *Nucleic acids research* 39: D596-600
- Wolfe AJ, Visick KL. 2008. Get the message out: cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. *Journal of bacteriology* 190: 463-75
- Wolfgang MC, Lee VT, Gilmore ME, Lory S. 2003. Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway. *Developmental cell* 4: 253-63
- Wolters DA, Washburn MP, Yates JR, 3rd. 2001. An automated multidimensional protein identification technology for *shotgun* proteomics. *Analytical chemistry* 73: 5683-90
- Wu H, Kato J, Kuroda A, Ikeda T, Takiguchi N, Ohtake H. 2000. Identification and characterization of two chemotactic transducers for inorganic phosphate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 182: 3400-4
- Yi X, Yamazaki A, Biddle E, Zeng Q, Yang CH. 2010. Genetic analysis of two phosphodiesterases reveals cyclic diguanylate regulation of virulence factors in *Dickeya dadantii*. *Molecular microbiology* 77: 787-800
- Yoneyama H, Nakae T. 1996. Protein C (OprC) of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* is a copper-regulated channel protein. *Microbiology* 142 (Pt 8): 2137-44
- Yu NY, Wagner JR, Laird MR, Melli G, Rey S, et al. 2010. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* 26: 1608-15
- Zhang LH. 2010. A novel C-di-GMP effector linking intracellular virulence regulon to quorum sensing and hypoxia sensing. *Virulence* 1: 391-4