

UCH-FC  
MA6-Microb  
0775  
C.I

**ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS PROTEÓMICOS Y  
FENOTÍPICOS DE LOS MUTANTES DE LA  
SÍNTESIS DE LOS POLIFOSFATOS EN  
*Pseudomonas aeruginosa* PAO1**



**Tesis  
Entregada a la  
Universidad de Chile  
en Cumplimiento Parcial de los Requisitos  
Para Optar al Grado de**

**Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Microbiología**

**Por**

**Javiera Rocío Ortiz Severín**

**Agosto, 2013**

**Director de Tesis: Dr. Francisco P. Chávez**

**Codirector de Tesis: Dr. Nicolás Guilliani**

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACION**  
**TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata.

**JAVIERA ROCÍO ORTÍZ SEVERÍN**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Microbiología, en el examen de defensa privada de tesis rendida el día 05 de Diciembre de 2012.


**Director de Tesis**

Dr. Francisco Chávez.

  
.....  



**Co-Director de Tesis**

Dr. Nicolás Guiliani

  
.....

**Comisión de Evaluación:**

Dr. Marcelo Baeza

  
.....

Dr. Ricardo Cabrera

  
.....



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer de forma póstuma a mi abuela Virginia Pérez Cabezas, quien me contagió su amor por la naturaleza y contestó todas mis más inimaginables preguntas.

Agradezco también a todos los que participaron en mi formación. Primero a mis padres (y a su infinita paciencia), a mis hermanos y familia, a los profesores de colegio que abrieron mi mundo a lo desconocido, y a los de la universidad que me enseñaron una nueva forma de pensar. Agradezco también a incontables compañeros que hicieron mis días más fáciles y entretenidos.





## ÍNDICE DE MATERIAS

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. VIRULENCIA EN <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i></b> .....	<b>2</b>
<b>1.2. LOS POLIFOSFATOS EN <i>P. AERUGINOSA</i></b> .....	<b>4</b>
<b>1.3. EL PEZ CEBRA COMO MODELO DE INFECCIÓN BACTERIANA</b> .....	<b>8</b>
<b>1.4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>10</b>
<b>1.5. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>11</b>
<b>1.6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>11</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1. CEPAS BACTERIANAS</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2. MEDIOS DE CULTIVO</b> .....	<b>12</b>
<b>2.3. CURVAS DE CRECIMIENTO</b> .....	<b>13</b>
<b>2.4. MEDICIÓN DE SIDERÓFOROS</b> .....	<b>14</b>
<b>2.4.1. Ensayos de difusión en agar CAS</b> .....	<b>14</b>
<b>2.4.2. Medición espectrofotométrica</b> .....	<b>15</b>
<b>2.5. DETECCIÓN DE ACIL-HOMOSERINA LACTONAS (AHLs) EN CULTIVOS LÍQUIDOS DE <i>P. AERUGINOSA</i></b> .....	<b>19</b>
<b>2.5.1. Extracción orgánica de AHLs</b> .....	<b>19</b>
<b>2.5.2. Separación de los extractos orgánicos por cromatografía en capa fina</b> .....	<b>19</b>
<b>2.5.3. Ensayo de biosensor para la detección de AHLs</b> .....	<b>20</b>
<b>2.6. MICROARREGLOS FENOTÍPICOS</b> .....	<b>20</b>
<b>2.6.1. Análisis de los datos</b> .....	<b>21</b>
<b>2.7. COMPARACIÓN DE LOS PROTEOMAS TOTALES DE LAS CEPAS DE <i>P. AERUGINOSA</i> EN DISTINTA DISPONIBILIDAD DE FOSFATO</b> .....	<b>21</b>
<b>2.7.1. Preparación de los extractos totales de proteínas</b> .....	<b>21</b>
<b>2.7.2. Análisis del proteoma total mediante marcaje isotópico</b> .....	<b>22</b>



2.7.3. <i>Análisis de los datos de proteómica</i> .....	23
2.8. EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE LAS DISTINTAS CEPAS BACTERIANAS EN EL PEZ MODELO DANIO RERIO .....	24
2.8.1. <i>Método de infección por bacterias en el pez cebra</i> .....	24
2.8.2. <i>Monitoreo de la infección y curvas de sobrevivencia</i> .....	25
3. RESULTADOS .....	26
3.1. SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO .....	26
3.2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS MUTANTES DE LA SÍNTESIS DE POLIFOSFATOS (PPK1 Y PPK2) EN <i>P. AERUGINOSA</i> PAO1 .....	27
3.2.1. <i>Crecimiento bacteriano y morfología macroscópica</i> .....	27
3.2.2. <i>Evaluación de la producción de sideróforos</i> .....	30
3.2.3. <i>Medición espectrofotométrica de los factores de virulencia pioverdina y piocianina</i> .....	31
3.2.4. <i>Comparación de la producción de moléculas autoinducidas de tipo acil-homoserina lactonas en las distintas cepas de P. aeruginosa PAO1</i> .....	34
3.3. ENSAYOS FENOTÍPICOS A GRAN ESCALA .....	36
3.3.1. <i>Microarreglos fenotípicos de las cepas de P. aeruginosa PAO1</i> .....	36
3.3.2. <i>Comparación de los proteomas totales mediante proteómica cuantitativa</i> .....	41
3.4. EFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA VIRULENCIA BACTERIANA .....	52
3.4.1. <i>Desarrollo de un método de infección no invasivo en el modelo animal pez cebra</i> .....	53
3.4.2. <i>Curvas de sobrevivencia</i> .....	54
3.4.3. <i>Efectos de la toxicidad bacteriana en el pez cebra</i> .....	56
3.4.4. <i>Producción de pigmentos tóxicos en los cultivos bacterianos utilizados para los ensayos de infección en pez cebra</i> .....	60
4. DISCUSIÓN .....	62
4.1. ANÁLISIS DE LOS MICROARREGLOS FENOTÍPICOS .....	62
4.2. CAMBIOS EN LA VIRULENCIA DE LAS CEPAS MUTANTES PPK1 Y PPK2 .....	66
4.2.1. <i>Desarrollo de un método de infección no invasivo en el modelo animal pez cebra</i> .....	72

<b>5. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>75</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>77</b>
<b>7. ANEXO.....</b>	<b>85</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO.....	12
TABLA 2. TASA DE CRECIMIENTO Y TIEMPO GENERACIONAL DE LAS CEPAS MUTANTES Y LA SILVESTRE .....	29
TABLA 3. RESUMEN DE LOS ANÁLISIS DE PROTEÓMICA CUANTITATIVA PARA LAS DISTINTAS CEPAS DE <i>P. AERUGINOSA</i> PAO1.....	42
TABLA 4. LISTADO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO DEL FOSFATO QUE CAMBIARON SIGNIFICATIVAMENTE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN EN LOS ANÁLISIS DE PROTEÓMICA CUANTITATIVA .....	47
TABLA 5. LISTADO DE PROTEÍNAS DE TRANSPORTE QUE CAMBIARON SIGNIFICATIVAMENTE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN EN LOS ANÁLISIS DE PROTEÓMICA CUANTITATIVA .....	48
TABLA 6. LISTADO DE LAS PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA PRODUCCIÓN Y REGULACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA, QUE CAMBIARON LOS NIVELES DE EXPRESIÓN EN LOS ANÁLISIS DE PROTEÓMICA CUANTITATIVA .....	50
TABLA 7. CONTEO DE CÉLULAS VIABLES DE LA SUSPENSIONES BACTERIANAS UTILIZADAS EN EL ENSAYO DE SOBREVIVENCIA CON EL PEZ CEBRA.....	53
TABLA 8. ESCALA DE INFECCIÓN DESARROLLADA A PARTIR DE PARÁMETROS FISIOLÓGICOS OBSERVABLES DURANTE LA INFECCIÓN DEL PEZ CEBRA POR <i>P. AERUGINOSA</i> PAO1 .....	56
TABLA SUPLEMENTARIA 1. LISTADO DE PROTEÍNAS QUE AUMENTAN SU EXPRESIÓN EN <i>P. AERUGINOSA</i> PAO1 SILVESTRE CRECIDA EN CARENCIA DE FOSFATO CON RESPECTO A LA CONDICIÓNDE EXCESO DE FOSFATO EN LOS ANÁLISIS DE PROTEÓMICA CUANTITATIVA.....	85
TABLA SUPLEMENTARIA 2. LISTADO DE PROTEÍNAS QUE DISMINUYEN SU EXPRESIÓN EN <i>P. AERUGINOSA</i> PAO1 SILVESTRE CRECIDA EN CARENCIA DE FOSFATO CON RESPECTO A LA CONDICIÓNDE EXCESO DE FOSFATO.....	87
TABLA SUPLEMENTARIA 3. LISTADO DE PROTEÍNAS QUE AUMENTAN SU EXPRESIÓN EN LOS MUTANTES DE SÍNTESIS DE LOS POLIP EN CARENCIA DE FOSFATO CON RESPECTO A LA CEPA PAO1 SILVESTRE EN LA MISMA CONDICIÓN, EN LOS ANÁLISIS DE PROTEÓMICA CUANTITATIVA.....	88
TABLA SUPLEMENTARIA 4. LISTADO DE PROTEÍNAS QUE DISMINUYEN SU EXPRESIÓN EN LOS MUTANTES DE SÍNTESIS DE LOS POLIP EN CARENCIA DE FOSFATO CON RESPECTO A LA	





CEPA PAO1 SILVESTRE EN LA MISMA CONDICIÓN, EN LOS ANÁLISIS DE PROTEÓMICA CUANTITATIVA.....	92
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. MOLÉCULA DE POLIFOSFATO .....	5
FIGURA 2. ECUACIONES DE LAS ACTIVIDADES DE LAS ENZIMAS PPK1 Y PPK2 .....	6
FIGURA 3. CURVA DE CALIBRACIÓN DE MESILATO DE DEFEROXAMINA (DESFERAL) EN PLACAS CAS.....	15
FIGURA 4. ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE LA PIOCIANINA Y PIOVERDINA EN LOS DISTINTOS MEDIOS.....	17
FIGURA 5. CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LA PIOVERDINA Y LA PIOCIANINA EN LOS DISTINTOS MEDIOS .....	18
FIGURA 6. CULTIVOS LÍQUIDOS (A, B Y C) Y SÓLIDOS (D Y E) EN MEDIO NGM SUPLEMENTADO ALTO FOSFATO ( $\uparrow$ PI) Y BAJO FOSFATO ( $\downarrow$ PI) .....	28
FIGURA 7. CURVA DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS EN ESTUDIO EN MEDIO NGM +GLICEROL 1%, EN CARENCIA Y EXCESO DE FOSFATO ( $\uparrow$ PI Y $\downarrow$ PI RESPECTIVAMENTE) .....	29
FIGURA 8. MEDICIÓN DE SIDERÓFOROS TOTALES EN CULTIVOS LÍQUIDOS DE LAS DISTINTAS CEPAS DE <i>P. AERUGINOSA</i> MEDIANTE EL ENSAYO DE DIFUSIÓN EN PLACAS CAS .....	31
FIGURA 9. MEDICIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE PIOCIANINA Y PIOVERDINA EN SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE LAS CEPAS MUTANTES Y SILVESTRE DE <i>P.</i> <i>AERUGINOSA</i> PAO1 .....	33
FIGURA 10. DETECCIÓN DE <i>N</i> -ACIL HOMOSERINA LACTONAS EN SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE <i>P. AERUGINOSA</i> PAO1 POR CROMATOGRFÍA DE CAPA FINA .....	35
FIGURA 11. RESULTADOS CINÉTICOS DE LA PLACA PM1 DE FUENTES DE CARBONO DE LOS MICROARREGLOS FENOTÍPICOS DE BIOLOG .....	37
FIGURA 12. DIAGRAMAS DE VENN DE LA COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE LOS MICROARREGLOS FENOTÍPICOS PARA LAS CEPAS MUTANTES <i>PPK1</i> Y <i>PPK2</i> CON LA CEPA SILVESTRE .....	38
FIGURA 13. REPRESENTACIÓN DE LOS PERFILES FENOTÍPICOS OBTENIDOS POR ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO PARA LAS PRUEBAS METABÓLICAS EN LOS MUTANTES <i>PPK1</i> Y <i>PPK2</i> CON RESPECTO A LA CEPA SILVESTRE.....	39

<b>FIGURA 14. ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO PARA LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A COMPUESTOS QUÍMICOS DE LAS CEPAS MUTANTES <i>PPK1</i> Y <i>PPK2</i> CON RESPECTO A LA CEPA SILVESTRE .....</b>	<b>40</b>
<b>FIGURA 15. GRÁFICOS RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE PROTEÓMICA CUANTITATIVA AGRUPADOS EN CATEGORÍAS FUNCIONALES PRINCIPALES .....</b>	<b>43</b>
<b>FIGURA 16. RESULTADOS DE PROTEÓMICA CUANTITATIVA AGRUPADOS EN SUBCATEGORÍAS FUNCIONALES SEGÚN LOS COGs.....</b>	<b>44</b>
<b>FIGURA 17. CURVAS DE SUPERVIVENCIA DE KAPLAN-MEIER PARA LARVAS DE PEZ CEBRA INFECTADAS CON BACTERIAS CRECIDAS EN MEDIO NGM CON ALTO O BAJO FOSFATO .....</b>	<b>55</b>
<b>FIGURA 18. EFECTOS DE LA INFECCIÓN POR <i>P. AERUGINOSA</i> PAO1 EN EL PEZ CEBRA .....</b>	<b>58</b>
<b>FIGURA 19. ESTADOS DE INFECCIÓN DEL PEZ CEBRA PRODUCTO DE LA INCUBACIÓN CON LAS DISTINTAS CEPAS DE <i>P. AERUGINOSA</i> PAO1 .....</b>	<b>59</b>
<b>FIGURA 20. MEDICIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE PIOVERDINA Y PIOCIANINA EN SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE BACTERIAS UTILIZADOS PARA LA INCUBACIÓN CON PEZ CEBRA .....</b>	<b>61</b>
<b>FIGURA SUPLEMENTARIA 1. RESULTADOS CINÉTICOS DE TODOS LOS MICROARREGLOS FENOTÍPICOS ANALIZADOS PARA LA COMPARACIÓN ENTRE EL MUTANTE <i>PPK1</i> Y LA CEPA SILVESTRE .....</b>	<b>95</b>
<b>FIGURA SUPLEMENTARIA 2. RESULTADOS CINÉTICOS DE TODOS LOS MICROARREGLOS FENOTÍPICOS ANALIZADOS PARA LA COMPARACIÓN ENTRE EL MUTANTE <i>PPK2</i> Y LA CEPA SILVESTRE .....</b>	<b>96</b>

## ABREVIATURAS

ABC	ATP-Binding Cassette
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHL	<i>N</i> -acil homoserina lactonas
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
CAS	Cromo azurol S
CCF	Cromatografía en capa fina
COG	Cluster of Orthologous Groups
Dpf	Días post fecundación
FDR	False Discovery Rate
GTP	Guanosín trifosfato
Hpf	Horas post fecundación
Hpi	Horas post infección
ICPL	Isotope-coded protein labeling
Log	Logaritmo
LPS	Lipopolisacárido
MDR	Multiple drug resistant
NGM	Nematode Growth Media
Pch	Pioquelina
Pi	Ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ )
PM	Phenotype Microarrays
poliP	Polifosfato inorgánico
PPK1	Polifosfato quinasa 1
PPK2	Polifosfato quinasa 2
PQS	Pseudomonas Quinolone Signal
Pvd	Pioverdina
Pyo	Piocianina
QS	Quórum sensing
RND	Resistance-Nodulation-Cell Division
T3SS	Sistema de Secreción Tipo 3
T6SS	Sistema de Secreción Tipo 6
TCA	Ciclo de los ácidos tricarbónicos
UFC	Unidades formadoras de colonias



## RESUMEN

Los polifosfatos inorgánicos (poliP) son biopolímeros lineales que se encuentran en todos los seres vivos y son esenciales en el metabolismo bacteriano. En *Pseudomonas aeruginosa*, patógeno oportunista de animales y plantas y principal causa de infecciones nosocomiales, las alteraciones en el metabolismo de los poliP causan numerosas disfunciones estructurales y funcionales. Mutantes de la enzima polifosfato quinasa (PPK1), que cataliza reversiblemente la síntesis de poliP a partir de ATP, son más sensibles a la fase estacionaria de crecimiento, al calor, a cambios en el pH, al estrés causado por agentes oxidantes, cambios osmóticos, radiación y antibióticos. También se ha descrito que estos mutantes tienen una menor sobrevivencia durante la fase estacionaria. *P. aeruginosa* posee dos enzimas PPK, sin embargo la PPK2, que sintetiza principalmente GTP a partir de poliP de forma reversible, ha sido poco estudiada y nada se sabe de los efectos de su mutación en esta bacteria.

Debido a que los poliP generan efectos pleiotrópicos en la célula, se realizaron aproximaciones con técnicas ómicas para estudiar el efecto de las mutaciones en el gen *ppk1* y en el gen *ppk2* en *P. aeruginosa* PAO1, tanto a nivel fenotípico como proteómico, además de ensayos de virulencia en un modelo animal para evaluar su letalidad.

Mediante los ensayos de microarreglos fenotípicos (Biolog Inc., CA) se determinó que no existen grandes diferencias en cuanto a la utilización de nutrientes entre ambos mutantes y la cepa silvestre, sin embargo se observó un marcado aumento en la sensibilidad de los mutantes frente a antibióticos y agentes tóxicos. Esto puede ser causado por la disminución en proteínas relacionadas con la biogénesis de la pared y



membrana celular, y de bombas de eflujo de drogas del tipo MexEF-OprN, reguladas por MvaT, lo que se observó en los resultados de proteómica cuantitativa.

La virulencia de los mutantes nulos del gen *ppk1* y del gen *ppk2* de *P. aeruginosa* PAO1, se evaluó midiendo la producción de pigmentos tóxicos y mediante el método de infección por inmersión en el modelo animal de pez cebra. Para esto se realizaron curvas de sobrevivencia incubando a los peces con las cepas mutantes *ppk1* y *ppk2*, la cepa silvestre de *P. aeruginosa* y la cepa no virulenta *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  como control, todas crecidas en medios con alto y bajo fosfato (Pi). A diferencia de la cepa PAO1 silvestre que sólo fue letal en condiciones de bajo Pi, la cepa mutante *ppk2* lo fue en ambos medios. Contrariamente, el mutante *ppk1* generó una baja mortalidad en las dos condiciones ensayadas. En relación a los factores de virulencia, se determinó una mayor producción de piocianina en el mutante *ppk2* en carencia y exceso de Pi, aumento compartido por el mutante *ppk1* en carencia de Pi. El mutante *ppk1* mostró una marcada disminución en la producción de pioverdina en ambas condiciones, contrario a lo observado en el mutante *ppk2* que presentó un aumento en la producción de este sideróforo en comparación con la cepa silvestre. En ambos mutantes se comprobaron estas diferencias en la producción de pioverdina mediante proteómica cuantitativa. De esta forma, la mutación en el gen *ppk1*, pero no en el gen *ppk2*, genera una disminución en la producción de dos de los factores de virulencia evaluados, y una atenuación en la virulencia en un modelo animal de infección, lo que sumado al aumento en la sensibilidad a antibióticos hace al metabolismo de los polifosfatos un buen blanco para nuevas drogas antimicrobianas.

## ABSTRACT

Inorganic polyphosphates (polyP) are linear biopolymers found in all living organisms and are essential in bacterial metabolism. In *Pseudomonas aeruginosa*, an opportunistic pathogen of animals and plants and the leading cause of nosocomial infections, alterations in the metabolism of polyP cause numerous structural and functional disorders. Mutants of polyphosphate kinase enzyme (PPK1), which reversibly catalyzes the synthesis of ATP from polyP, are more sensitive to heat, pH changes, stress caused by oxidizing agents, osmotic changes, radiation and antibiotics. Also it has been described that these mutants have a lower survival during stationary phase. *P. aeruginosa* possess two enzymes PPK, however PPK2, which mainly synthesized from GTP reversibly polyP, has been little studied and nothing is known about the effects of its mutation in *P. aeruginosa*.

Because polyP has pleiotropic effects in the cell, we used omics approaches to study the effect of null mutations in the genes *ppk1* and *ppk2* in *P. aeruginosa* PAO1, performed at a phenotypic and proteomic level, as well as virulence assays in an animal model to evaluate the mutants lethality.

Through phenotypic microarray assays (Biolog Inc., CA) we determined that there are no major differences in nutrient utilization between the mutant and the wild type, however, there was a marked increase in the sensitivity of the mutants against antibiotics and toxic agents. This may be caused by the decrease in proteins related to wall and cell membrane biogenesis, and drug efflux pumps of the type-OprN MexEF regulated by MvaT, which was observed in the results of quantitative proteomics.

Virulence of mutants *ppk1* and *ppk2* of *P. aeruginosa* PAO1 was evaluated by measuring the production of toxic pigments by the method of infection by immersion in

the animal model zebrafish. For this, Kaplan-Meier survival curves were performed, incubating the fish with the mutant strains *ppk1* and *ppk2*, the wild-type strain of *P. aeruginosa* PAO1 and the avirulent strain *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  as a control, all grown in media with high and low phosphate concentrations (Pi). Unlike the PAO1 wild-type strain which was lethal only under low Pi, the *ppk2* mutant strain was lethal in both media. In contrast, the *ppk1* mutant generated low mortality in the two conditions tested. In relation to the virulence factors, we determined that the production of pyocyanin in the *ppk2* mutant was higher than the wild-type strain in low and high Pi. The *ppk1* mutant increase the pyocyanin production only in phosphate deficiency, but it showed a marked decrease in pyoverdine in both conditions, contrary to what is observed in the mutant *ppk2* which presented a notorious increase in the production of this siderophore compared with the wild-type strain. These differences in pyoverdine production were confirmed by quantitative proteomics in both mutants.

Thus mutations in the gene *ppk1* but not in the *ppk2* generated a decrease in the production of two virulence factors tested, and an attenuation of the virulence in an animal model of infection, which added to the increased sensitivity to antibiotics, makes polyphosphate metabolism a good target for new antimicrobial drugs.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria Gram negativa de metabolismo muy versátil que se encuentra en un amplio rango de ambientes, incluyendo distintos tipos de suelo, pantanos, zonas costeras y hábitats acuáticos, además de tejidos animales y vegetales. Esta ubicuidad y versatilidad ecológica se debe a su gran complejidad genética, ya que con 6,3 millones de pares de bases y 5.570 marcos de lectura abiertos, es uno de los genomas bacterianos más grandes hasta ahora secuenciado (117). Esto le confiere, entre otras cosas, la capacidad de crecer en ambientes facultativamente anaeróbicos con aceptores externos alternativos de electrones, o fermentar arginina o piruvato, aunque su metabolismo se basa principalmente en el catabolismo oxidativo. Aunque los azúcares son metabolizados eficientemente, no son el sustrato preferido y son degradados por la vía de Enter-Doudoroff. Sus fuentes de carbono o nitrógeno preferidas son ácidos grasos de cadena corta, aminoácidos y poliaminas, pero también puede degradar fuentes de carbono complejas como n-alcanos, halogenados y aromáticos (xenobióticos) (32, 33, 37, 44, 50, 74).

*P. aeruginosa* además se caracteriza por ser un patógeno oportunista de incidencia nosocomial, y es el principal agente de infecciones tanto agudas como crónicas en humanos que presenten compromiso del sistema inmune, pudiendo afectar el sistema respiratorio principalmente en pacientes con fibrosis quística, el tracto urinario, colonizar dispositivos médicos como catéteres y otros implantes, heridas y quemaduras extensas, incluso llegando a causar afecciones sistémicas como la septicemia (28, 79, 98). Estas infecciones presentan un gran desafío médico, ya que *P. aeruginosa* posee resistencia intrínseca a numerosos antibióticos (46). Algunos de los mecanismos asociados a la resistencia a múltiples drogas es la disminución de la expresión de



porinas de membrana, el engrosamiento de la pared celular y el aumento en la producción de exopolisacárido, y el transporte activo de drogas al exterior de la célula, mediado por bombas de eflujo RND (Resistance-Nodulation-Cell Division), o bombas tipo Mex (2, 65, 107).

### **1.1. Virulencia en *Pseudomonas aeruginosa***

Gran parte de la virulencia de *P. aeruginosa* se ha atribuido a su habilidad para secretar numerosos compuestos tóxicos y degradativos, incluyendo proteasas y exotoxinas, entre otros. Los factores de virulencia han sido definidos por A. Casadevall como cualquier componente microbiano capaz de causar daño al hospedero (14), y *P. aeruginosa* posee un arsenal de ellos. Además de los ya mencionados que se consideran como factores de virulencia clásicos, existen otros que le permiten colonizar y sobrevivir en el hospedero como exopolisacáridos, el sistema de secreción tipo 3 (T3SS), mecanismos de adherencia y formación de biopelícula, que son regulados por complejas y extensas vías de señalización que sensan moléculas externas y endógenas.

Probablemente el sistema más estudiado en *P. aeruginosa* y otros Gram negativos es el sistema de comunicación bacteriana mediado por *N*-acil homoserina lactonas (AHL), o "Quórum sensing" (QS) (29, 85). Las AHL consisten en una cadena de ácidos grasos de cadena variable unida por un enlace peptídico al anillo lactona (30). Estas son sintetizadas por proteínas de la familia LuxI, y son sensadas por proteínas que son además reguladores transcripcionales, de la familia LuxR. Luego de que una cierta concentración umbral de AHL es producida (que se correlaciona con la densidad

celular), se forma un complejo entre la AHL y la proteína receptora LuxR endógena, permitiendo su unión al ADN (39, 40).

En *P. aeruginosa* existen dos sistemas QS de este tipo que tienen una relación jerárquica: el sistema Las y el Rhl. El primero se compone de la sintasa LasI, la cual sintetiza 3-oxo-C12-HL, la que es reconocida por el regulador transcripcional LasR, y el segundo posee una sintasa de C4-HL, RhlI, y el regulador RhlR (93, 94). El sistema Las regula la expresión de múltiples factores de virulencia relacionados con la fase aguda de la infección y el daño celular en el hospedero, incluyendo las elastasas LasA y LasB, la exotoxina A y proteasas alcalinas, además de activar el sistema Rhl y a sí mismo, de forma que la activación del sistema LasIR produce una retroalimentación positiva y permite la activación más tardía del sistema RhlIR (42, 54, 69, 125). Este último también genera una retroalimentación positiva, además de inducir la expresión de otros genes como los responsables de la síntesis de ramnolípidos que actúan como surfactantes durante de la infección, y de reprimir la expresión de los genes relacionados con el T3SS (9). Adicionalmente a los sistemas LasIR y RhlIR existen varios homólogos de LuxR sin su par LuxI, los cuales se han denominado homólogos LuxR huérfanos. Uno de ellos es la proteína QscR, la cual forma complejos con LasR y RhlR retardando la expresión de factores de virulencia en estadios tempranos, lo que disminuye la virulencia *in vivo* e *in vitro* (70). Otros reguladores conocidos hasta el momento que contribuyen a la temporalidad y nivel de expresión de estos sistemas QS son: RsaL (represor transcripcional del sistema Las) (23), QteE (previene la acumulación postraduccional de LasR y de RhlR) (113) y QsIA (previene la activación temprana de los sistemas de QS formando complejos con LasR que impiden su unión al ADN) (108).

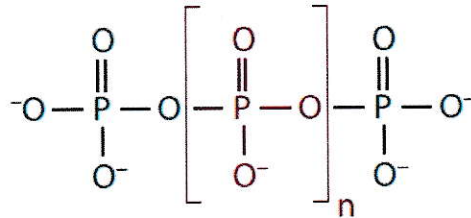
Existe otro sistema autoinductor en *P. aeruginosa* que se activa en forma similar a los mencionados, pero se basa en moléculas derivadas de quinolonas llamadas PQS (Pseudomonas Quinolone Signal) que al llegar a una concentración umbral, se unen a un receptor (MvfR o PqsR) que regula la expresión de genes relacionados con la síntesis de PQS y de fenacinas como el pigmento tóxico piocianina (13, 25). Otros dos reguladores son MvaT y MvaU, que también están involucrados en la síntesis de PQS. Al mutar estos reguladores aumenta la resistencia a antibióticos y la producción de lectinas PA-IL y de piocianina, pero hay datos que sugieren que podría mediar la síntesis de estos compuestos directamente. También se ha demostrado que MvaT por sí sólo es un regulador global de los genes de virulencia en *P. aeruginosa* y es capaz de reprimir la expresión de las bombas MexEF-OprN (27, 65, 126, 131).

A pesar de todo el conocimiento que se ha acumulado en relación a la comunicación en *P. aeruginosa*, falta todavía mucho por saber con respecto a la interconexión de estos sistemas, la regulación de su expresión y de los factores de virulencia, y más importante, su relación con el proceso infeccioso y el desarrollo de la enfermedad. Además, la patogénesis y el proceso infeccioso son multifactoriales, y el estado fisiológico del hospedero y del sitio de infección afecta la combinación de factores de virulencia que contribuyen para generar la enfermedad.

## **1.2. Los Polifosfatos en *P. aeruginosa***

Los polifosfatos inorgánicos (poliP) (Figura 1) son macromoléculas de decenas o centenas de residuos de ortofosfato (Pi) unidos por enlaces fosfoanhídrido de alta energía. Estos polímeros se encuentran ampliamente distribuidos en Arquea, Bacteria y Eucaria, y se asocian a numerosas funciones biológicas, incluyendo el crecimiento celular, la respuesta al estrés físico y químico, y la adaptación a ambientes extremos.

Además de ser sintetizados como reserva de fosfato y energía, es sustrato para la generación de nucleósidos trifosfato y Pi (62, 109, 134).



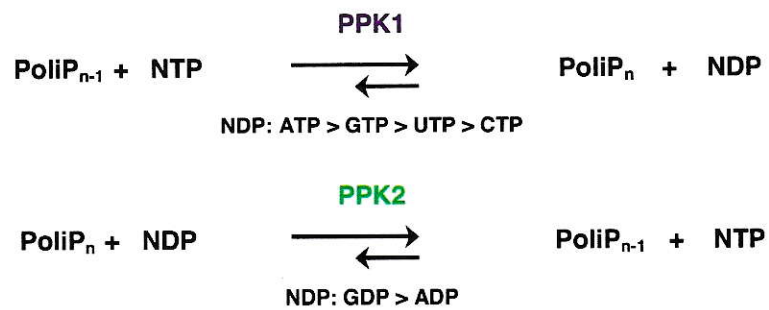
**Figura 1. Molécula de polifosfato.** El valor de  $n$  puede variar dependiendo del tipo de célula y el estado en que se encuentre.

En bacterias, el poliP es sintetizado por enzimas denominadas polifosfato quinazas que polimerizan el fosfato terminal de los nucleótidos trifosfatos en la cadena de poliP, siendo la polifosfato quinasa 1 (PPK1) la principal enzima responsable de su síntesis, y es degradada por una exopolifosfatasa que libera moléculas de ortofosfato desde los extremos de las cadenas de poliP. La enzima PPK1 está altamente conservada, pero fue descubierta inicialmente en la bacteria *Escherichia coli* por A. Kornberg y cols. (63). Fue descrita como un homotetrámero que se une a la membrana celular y cataliza la síntesis procesiva del polifosfato a partir del ATP. Aunque la reacción es reversible, el equilibrio está desplazado hacia la síntesis del poliP (64). La misma función y enzima fueron descritas para *Pseudomonas aeruginosa* en 1997 por A. Kuroda y A. Konberg (67), sin embargo se encontró que al hacer mutantes nulos para la enzima PPK1 en esta bacteria, se detectaba hasta un 20% de los niveles de poliP normales en la célula, lo que posteriormente se atribuyó a la presencia de la enzima polifosfato quinasa 2 (PPK2), un parálogo del gen *ppk1* capaz de sintetizar poliP. Sin embargo, la actividad enzimática de la PPK2 difiere de la PPK1 en dos puntos principales: (i) utiliza GTP y ATP como sustrato para la síntesis de poliP, y (ii) cataliza mayoritariamente la síntesis



de GTP a partir del polifosfato (actividad nucleósido bifosfato quinasa) a una tasa 75 veces mayor que la síntesis de poliP (51, 87) (Figura 2). Estas dos familias de enzimas están altamente conservadas, encontrándose ortólogos en más de 100 especies procariontes, muchas de ellas patógenas. Curiosamente, aunque el poliP está presente en todas las células vivas, hay bacterias que presentan sólo la enzima PPK1, sólo la PPK2, ambas o ninguna de ellas (102, 138).

La obtención de mutantes de la enzima PPK1 en numerosas bacterias ha permitido vislumbrar otros roles de esta macromolécula, distintos al de fuente energética o al simple almacenaje de fosfato.



**Figura 2. Ecuaciones de las actividades de las enzimas PPK1 y PPK2.**

Se ha descrito que el poliP puede inhibir la degradación del ARN, participar en la estructuración de canales de membrana y contribuir a la resistencia frente al estrés generado por calor, agentes oxidantes, cambios osmóticos, acidez, antibióticos y la radiación, entre otros (36, 56, 64, 100-102). Específicamente en *P. aeruginosa*, los mutantes del gen *ppk1* presentan defectos tanto estructurales como funcionales incluyendo la compactación del nucleóide, la distorsión de la envoltura celular y un déficit en la producción de los exopolímeros, haciéndola por tanto susceptible a la acción de antibióticos y la desecación (36). Además, los mutantes *ppk1* en *P.*

*aeruginosa* están afectados en los distintos tipos de motilidad (103), y aunque poseen flagelo y pili aparentemente normales, estos no son funcionales para la motilidad y tampoco para la adhesión al sustrato, lo que constituye el primer paso en la formación de las biopelículas. Por otro lado, se han visto alteraciones en la comunicación celular del tipo “quorum sensing” ya que producen bajas cantidades de moléculas autoinductoras. Como resultado, estos mutantes son deficientes en la formación de una biopelícula con estructura normal tridimensional, en la producción de diversos factores de virulencia y en el desarrollo de una infección en modelo de ratón quemado, donde su letalidad se ve disminuida (105). Adicionalmente, otros estudios en distintas bacterias patógenas también muestran defectos en el crecimiento y producción de factores de virulencia cuando se muta el gen *ppk1*. Por ejemplo, mutantes de *Salmonella* y *Shigella* muestran deficiencias en la invasión de células epiteliales (56), mutantes de *Neisseria meningitidis* son más propensos a ser eliminados por el suero humano (124) y mutantes de *Campylobacter jejuni* son defectuosos en la colonización de pollos y sobrevivencia en el intestino humano (55).

La enzima PPK1 ha sido ampliamente estudiada en muchos modelos bacterianos, y en comparación poco se conoce con respecto a la PPK2. Sin embargo, se han realizado estudios que asocian la actividad de PPK2 con procesos propios de la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, ya que es en esta etapa cuando su actividad aumenta más de 100 veces. Aquí el GTP es utilizado en la síntesis del alginato (entre otras funciones), exopolisacárido esencial para la virulencia de *P. aeruginosa* (51, 106). Por otro lado, se ha demostrado para *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium smegmatis* que la PPK2 cumple un importante rol en la supervivencia al estrés por acidez, hipoxia y calor (120, 121).

Todo esto convierte al metabolismo de los polifosfatos en un blanco deseable para la construcción de nuevos antibióticos que, en vez de crear una presión selectiva para el desarrollo de mecanismos de resistencia al buscar la muerte del microorganismo, busquen disminuir o eliminar la producción de factores de virulencia que generen daño y evadan las defensas del hospedero.

Debido a que alteraciones en el metabolismo de los polifosfatos generan múltiples efectos estructurales y funcionales, la relación entre el genotipo y los fenotipos observados puede dilucidarse mediante la aproximación de Biología de Sistemas, en la cual se utilizan técnicas de rastreo masivo en distintas escalas, como la proteómica cuantitativa y los microarreglos fenotípicos.

### **1.3. El pez cebra como modelo de infección bacteriana**

El pez cebra (*Danio rerio*) es un pequeño pez teleosteo de agua dulce que ha sido ampliamente utilizado como modelo de estudio en biología del desarrollo por más de 100 años, aunque estos extensos estudios han ayudado a dilucidar problemáticas de otras áreas debido a su similitud con modelos mamíferos. Algunas de las numerosas ventajas que popularizaron al pez cebra como modelo animal no mamífero es su fácil crianza y mantención en el laboratorio, su tiempo generacional relativamente corto y su numerosa progenie, lo que facilita estudios a gran escala (una hembra puede poner hasta 200 huevos por semana); tanto la fertilización como el desarrollo son externos, y los embriones son transparentes lo que permite manipularlos con facilidad.

El pez cebra es también un excelente modelo para realizar genética directa, su genoma actualmente está siendo secuenciado y los mutantes son relativamente simples de obtener y rastrear. Para estudios genéticos se han desarrollado mutantes

de inserción, transgénicos y morfantes entre otros. Todo esto ha permitido el desarrollo de la investigación biomédica, además de estudios de comportamiento, neurobiología, toxicología, farmacología e inmunología, basándose en su utilización como modelo de enfermedades humanas (119). Una característica importante de este pez es que presenta tanto inmunidad innata como adaptativa, las que se asemejan a las observadas en mamíferos. La primera respuesta inmune en aparecer es la innata, la cual es observable en etapas tempranas del desarrollo embrionario, sin embargo el completo desarrollo de la respuesta inmune adaptativa se alcanza entre las 4 y 6 semanas post fertilización, lo que permite el estudio de ambos sistemas por separado (77). Esto ha llevado al uso del pez cebra como modelo de infección de numerosos patógenos, incluidos los humanos, siendo especialmente útil para el estudio de patógenos oportunistas en etapas tempranas del desarrollo larval, donde sólo se encuentra presente la respuesta inmune innata.

Para los estudios de infección en larvas de pez cebra con distintos patógenos, y especialmente con *P. aeruginosa* se han desarrollado métodos invasivos en los cuales se inyecta una alta carga bacteriana directamente al torrente sanguíneo, ya sea por la vena caudal (11, 127), el valle circulatorio de vitelo (16, 96), o intraperitonealmente (49), dependiendo de la bacteria utilizada. Además de la alta mortalidad que genera este procedimiento, es poco útil para estudios masivos donde se busque probar distintas condiciones, por lo que es deseable el uso de técnicas menos complicadas como la inmersión estática (coincubación con bacterias). Se ha reportado el uso de esta técnica de forma eficiente para estudios de infección y enfermedad con microorganismos patógenos de peces, como las bacterias *Edwardsiella tarda* (128), *Flavobacterium columnare* (20) y *Mycobacterium marinum* (22), y algunos virus como el rhabdovirus de septicemia hemorrágica (VHSV) (31, 88). En este último se



comprobó que sólo la incubación con alta carga viral (alrededor de  $10^6$  virus/mL) y a baja temperatura (14-16°C), condiciones que podrían extrapolarse para la infección con otro tipo de bacterias. A nuestro conocimiento, sólo se ha intentado la inmersión estática como método de infección en el género *Pseudomonas* en estudios de la microbiota intestinal en peces gnotobióticos (6). Sin embargo, esto sienta un precedente para el uso de esta técnica en el estudio de la virulencia o de la enfermedad generada por otras bacterias de este género.

Además de *E. coli*, el organismo modelo *P. aeruginosa* PAO1 es el que concentra el mayor número de estudios en el metabolismo de los polifosfatos, es de fácil mantención y crecimiento en el laboratorio, y presenta su genoma secuenciado y disponible. Además, poseemos mutantes por transposición de los genes *ppk1* y *ppk2* (Jacobs y col., 2003). Por estas razones, sumado a la falta de conocimientos acerca de los efectos globales de las mutaciones en los genes involucrados en la síntesis de poliP y en especial el gen *ppk2*, nos hemos propuesto hacer estudios comparativos del proteoma y de los fenotipos asociados a la carencia de polifosfato en los mutantes *ppk1* y *ppk2*.

### **1.3. Hipótesis**

Las mutaciones en los genes de la síntesis de los poliP (*ppk1* y *ppk2*) en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 generan efectos similares observables a nivel proteómico, fenotípico y de virulencia.

#### **1.4. Objetivo general**

Realizar estudios comparativos a nivel proteómico, fenotípico y de la virulencia de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, comparando la cepa silvestre con los mutantes de las enzimas PPK1 y PPK2.

#### **1.5. Objetivos específicos**

1. Evaluar las diferencias fenotípicas observables entre las cepas mutantes *ppk1* y *ppk2* con la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PAO1, enfocándose en los fenotipos relacionados con factores de virulencia.
2. Realizar análisis comparativos cuantitativos de los fenotipos de las cepas silvestres y mutantes mediante microarreglos fenotípicos (Phenotype MicroArrays™).
3. Realizar análisis comparativos de los proteomas totales de las cepas silvestre, mutante del gen *ppk1* y del gen *ppk2* mediante proteómica cuantitativa usando marcaje con ICPL (marcaje isotópico diferencial de proteínas).
4. Analizar mediante algoritmos bioinformáticos los resultados obtenidos de los microarreglos fenotípicos y del proteoma.
5. Determinar las diferencias en la virulencia de las distintas cepas en un modelo de infección animal con el pez cebra (*Danio rerio*).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Cepas bacterianas

Las cepas mutantes de *P. aeruginosa* PAO1 se obtuvieron de la librería de mutantes por transposición de Jacobs y cols. (52). Estas cepas y las demás utilizadas en este estudio se muestran en la tabla a continuación.

**Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio.**

Bacteria	Descripción	Referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAO1	Cepa silvestre	(52)
PW9826	Mutante <i>ppk1</i> . Cepa derivada de PAO1 con un cassette de resistencia a tetraciclina insertado en el gen <i>ppk1</i> (PA5242); Mini-Tn5-Tet <sup>r</sup>	(52)
PW1235	Mutante <i>ppk2</i> . Cepa derivada de PAO1 con un cassette de resistencia a tetraciclina insertado en el gen <i>ppk2</i> (PA0141); Mini-Tn5-Tet <sup>r</sup>	(52)
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 $\alpha$	F $\phi$ 80d/ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44</i> $\lambda$ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	(45)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
NTL4 (pLZR4)	Derivado de NT1 ( $\Delta$ <i>traF</i> ) con una delección interna del locus <i>tetC58</i> , $\Delta$ <i>tetC58</i> , Tc <sup>s</sup> . Fusión de <i>traG</i> con <i>lacZ</i> en el plásmido.	(73)

### 2.2. Medios de cultivo

Las bacterias se crecieron rutinariamente en medio Luria-Bertani (LB, 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de NaCl a pH 7) suplementado con 50  $\mu$ g/mL de tetraciclina para las cepas mutantes *ppk1* y *ppk2*. El medio LB sólido se preparó en placas Petri con medio LB y agar al 1,5 %, y se suplementaron con antibióticos cuando fue necesario.

Las bacterias utilizadas para los experimentos de proteómica cuantitativa, los ensayos de infección en pez cebra y la correspondiente medición de sideróforos, fueron crecidas en medio NGM (Nematode Growth Media, 2,5 g/L de Peptona, 3 g/L de NaCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 µg/mL de colesterol, agar al 1,7% y tampón K-Ph equivalente a 25 mM de fosfato a pH 6), que se modificó sacándole el colesterol, disolviendo los componentes en agua nanopura y, cuando fue necesario, suplementándolo con glicerol al 1%. Este medio también fue utilizado como caldo sin agregarle el agar. En los casos donde se requirió cultivar a las bacterias en carencia de fosfato no se agregó el tampón K-Ph, y el pH del medio se ajustó con HCl. Esta condición se llamó bajo fosfato (↓Pi) y el medio con K-Ph, alto fosfato (↑Pi). Para la evaluación del crecimiento bacteriano y la producción de sideróforos, además de la extracción de acil-homoserina lactonas, las bacterias se crecieron en este mismo medio suplementado con glicerol al 1%.

Los ensayos de identificación de acil-homoserina lactonas se realizaron con el biosensor *Agrobacterium tumefaciens* NTL4. Esta cepa fue crecida en placas o cultivos líquidos, con medio LB o AB mínimo (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3 g/L; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L; NH<sub>4</sub>Cl 1 g/L; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,3 g/L; KCl 0,15 g/L; CaCl<sub>2</sub> 0,01 g/L; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2,5 mg/L; glucosa 0,5%), suplementado con 25 µg/mL de gentamicina.

### **2.3. Curvas de crecimiento**

Las bacterias se crecieron en matraces Erlenmeyer de 1 litro con 200 mL de medio NGM +glicerol 1% ↑Pi y ↓Pi. Los inóculos se hicieron a partir de cultivos de noche con antibióticos, los que fueron lavados 3 veces con el medio en el cual se iban a incubar luego de centrifugar las células a 8.000 g por 5 min. Se agregó la cantidad necesaria de estas células lavadas de forma que el matraz quedara con una densidad óptica a



600 nm ( $DO_{600}$ ) de 0,05. Los cultivos en triplicado se incubaron a 37°C y 175 rpm. Cada una hora se tomaron alícuotas de cada cultivo y se les midió la  $DO_{600}$  en un espectrofotómetro.

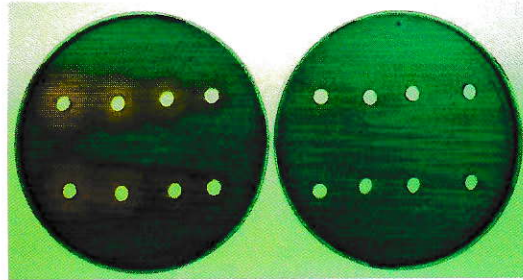
## **2.4. Medición de sideróforos y piocianina**

### **2.4.1. Ensayos de difusión en agar CAS para sideróforos**

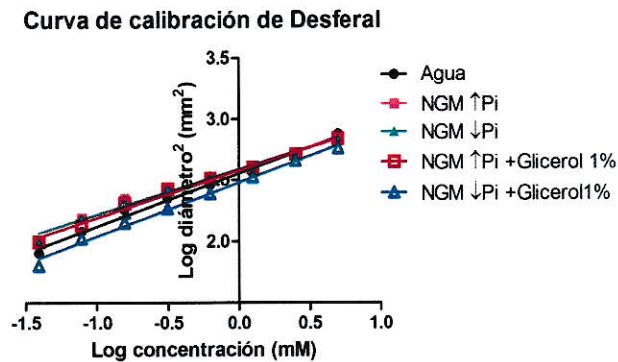
La medición de sideróforos totales se realizó según el método modificado para fluidos biológicos de S. H. Shin y cols. (112), el cual se basa en la capacidad del cromo azuro I S (CAS) de quelar hierro, cambiando su color de naranja a azul. Brevemente, 60,5 mg de CAS se disolvieron en 50 mL de agua nanopura y se mezclaron con 10 mL de una solución con 1 mM  $FeCl_2 \cdot 6H_2O$  y 10 mM HCl. A esta mezcla se agregaron 40 mL de agua con 72,9 mg de HDTMA y se autoclavó. Paralelamente se preparó una solución con 15 g de agar y 30,24 g de PIPES en 900 mL de agua nanopura y se ajustó el pH a 6,8. Luego de autoclavar se mezcló con la solución anterior. Se vertieron 25 mL en placas Petri, y una vez gelificadas se les hacen agujeros de 5 mm de diámetro con un perforador.

Para hacer la curva de calibración se utilizó Desferal (mesilato de deferoxamina), un sideróforo comercial derivado de *Streptomyces pilosus*, el cual fue diluido a distintas concentraciones en agua, NGM ↑Pi y ↓Pi, y NGM +glicerol 1% ↑Pi y ↓Pi (Figura 3). Se pusieron 50  $\mu$ L de soluciones en distintos medios (agua, NGM ↑Pi y ↓Pi, NGM +glicerol 1% ↑Pi y ↓Pi) de diluciones seriadas 1:2 a partir de una solución 5 mM. Las placas se incubaron a temperatura ambiente entre 2 y 5 días, luego de lo cual se midió el diámetro del halo y se estandarizó por la  $DO_{600}$ .

A



B



**Figura 3. Curva de calibración de mesilato de deferoxamina (desferal) en placas CAS.** (A) Ensayo de difusión en placas CAS para distintas concentraciones de desferal (de izquierda a derecha, diluciones seriadas 1/2 desde 5 mM a 0,039 mM), diluido en medio NGM $\uparrow$ Pi (arriba) y NGM $\downarrow$ Pi (abajo). (B) Curva de calibración de desferal en placas CAS diluido en distintos medios. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  error estándar.

Las curvas de desferal en los distintos medios difieren ligera pero significativamente ( $P < 0,0001$ ), por lo que se utilizaron las ecuaciones de las rectas de forma específica para cada medio.

Los ensayos de medición de sideróforos en fluidos se realizaron con 50  $\mu$ L de los sobrenadantes de cultivos de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 incubadas en medio NGM +glicerol 1% con  $\uparrow$ Pi y  $\downarrow$ Pi, por 3, 6 y 10 horas a 37°C y 175 rpm.

#### 2.4.2. Medición espectrofotométrica

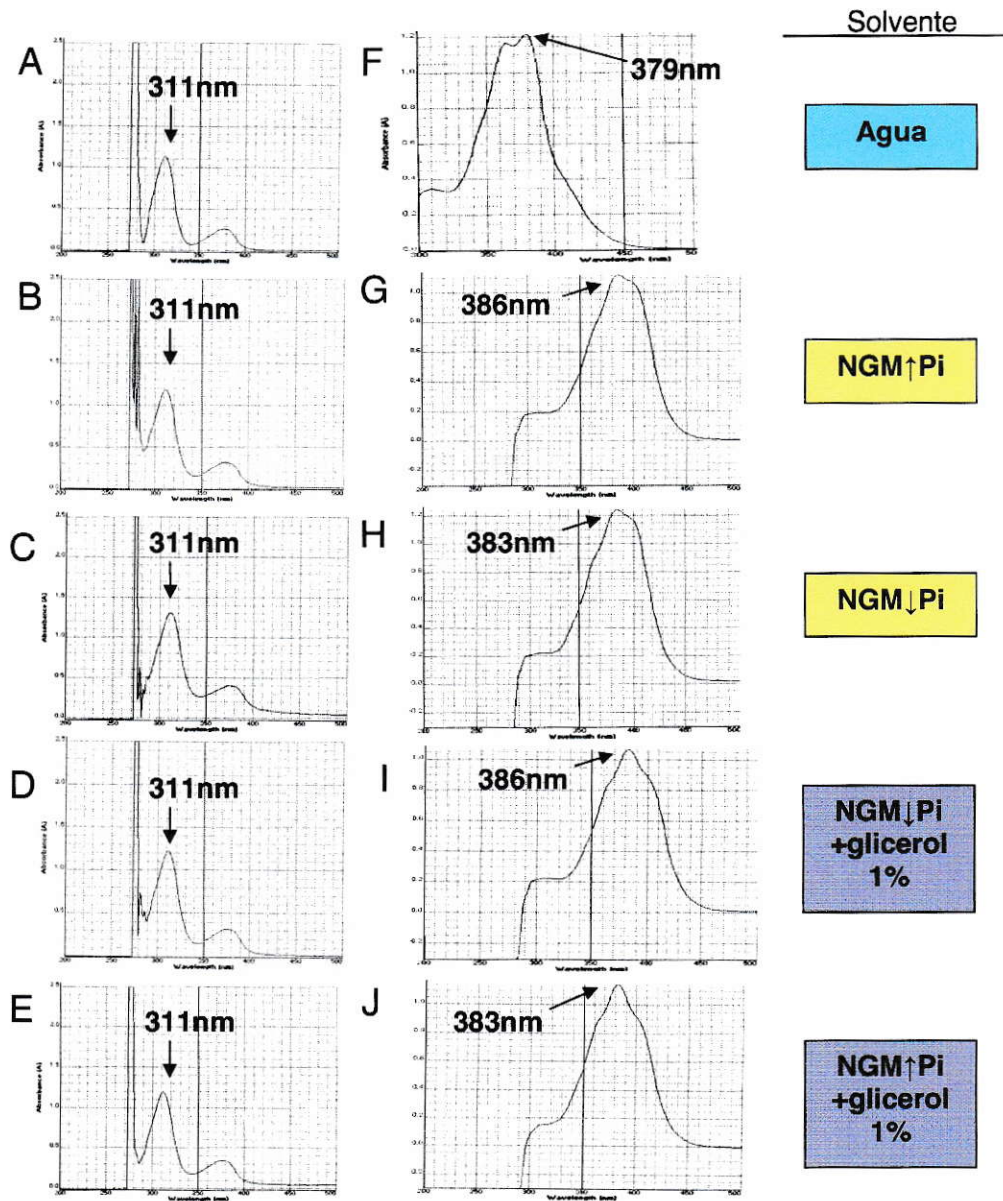
Debido a las diferencias en los protocolos de medición de la absorbancia de los distintos sideróforos de *P. aeruginosa* PAO1 encontrados, se realizaron barridos de

longitudes de onda entre 200 nm y 500 nm de soluciones puras de piocianina y pioverdina (Sigma-Aldrich) en distintos medios (agua, NGM $\uparrow$ Pi y  $\downarrow$ Pi, NGM +glicerol 1%  $\uparrow$ Pi y  $\downarrow$ Pi), para determinar la longitud de onda a la que se observa un mayor pico de absorbancia. Para este ensayo sólo se consideró a la pioverdina dentro de los sideróforos, y la piocianina ya que existen en forma comercial y por tanto pueden ocuparse como referencia.

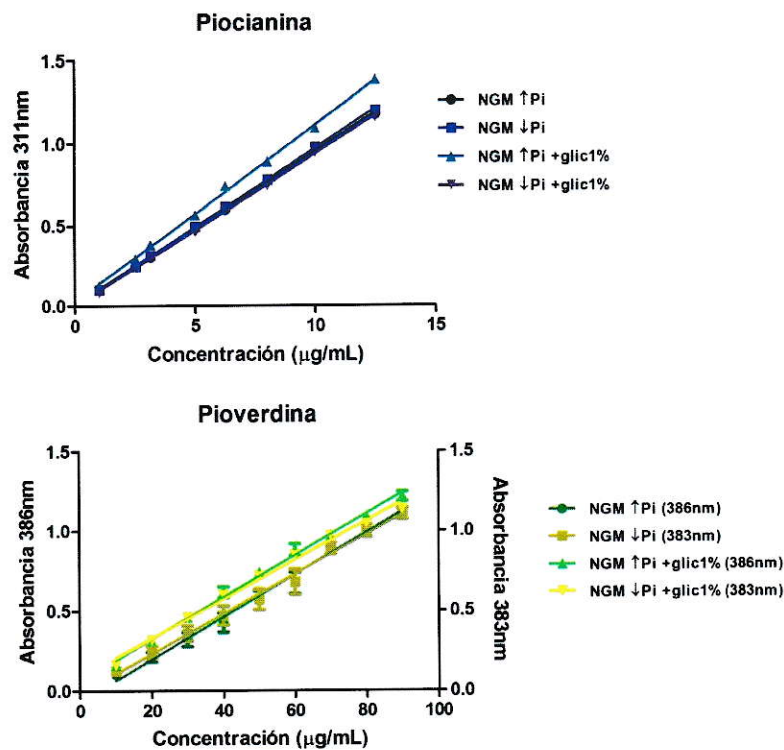
En los espectros se observó un máximo de absorbancia a los 311 nm para la piocianina en todos los medios probados (Figura 4A-E), mientras que en la pioverdina se observaron distintos picos de absorbancia según que esté disuelta en agua (379 nm, Figura 4F) o en los medios de cultivo, y difiere además entre los medios con alto fosfato (386 nm) o bajo fosfato (383 nm). Esta última variación es tan sólo de 3 nm, pero es consistente tanto para los medios suplementados con glicerol, como para los no suplementados (Figura 4G-J). Por esta razón, las mediciones se realizaron utilizando la longitud de onda específica para cada medio de cultivo donde se crecieron las bacterias.

Con los compuestos puros se realizaron curvas de calibración, midiendo la absorbancia de las soluciones estándar a la longitud de onda asociada a cada medio (Figura 5). Las pendientes de las curvas en los distintos medios son muy distintas para el caso de la piocianina ( $P < 0,0001$ ), y levemente distintas para la pioverdina ( $P = 0,053$ ) por lo que se utilizaron las ecuaciones de forma específica para el medio en el cual se realizó el cultivo y por tanto la medición de absorbancia. Estas curvas se utilizaron para la cuantificación de los pigmentos tóxicos en los cultivos de las distintas cepas de *P. aeruginosa*.





**Figura 4. Espectros de absorción de la picrocianina y picroverdina en los distintos medios.** (A-E) Barrido espectrofotométrico entre 200nm y 500nm para soluciones de picrocianina a una concentración de 12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . (F-J) Barrido espectrofotométrico para soluciones de picroverdina a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  entre 300nm y 500nm (F) y a 90  $\mu\text{g}/\text{mL}$  entre 200nm y 500nm (G-J). Los sideróforos se disolvieron en agua destilada (A y F), medio NGM $\uparrow$ Pi (B y G), medio NGM $\downarrow$ Pi (C y H), medio NGM+glicerol 1%  $\uparrow$ Pi (D y I), y medio NGM+glicerol 1%  $\downarrow$ Pi (E y J). Las flechas indican los picos de máxima absorbancia junto con la longitud de onda correspondiente.



**Figura 5. Curvas de calibración de la pioverdina y la picrocianina en los distintos medios.** Se midió la absorbancia de soluciones con distinta concentración de picrocianina (arriba) y pioverdina (abajo) en los medios NGM con ↑Pi y ↓Pi, y NGM +glicerol 1% con ↑Pi y ↓Pi. La picrocianina se midió a 311 nm en todos los medios, y la pioverdina a 386 nm en medios con alto fosfato, y a 383 nm en medios con bajo fosfato.

Para evaluar directamente la producción de pioverdina y picrocianina en medios sin metales, se tomaron alícuotas de cultivos de las distintas cepas de *P. aeruginosa* a las 3, 6 y 10 horas de incubación en medio NGM +glicerol 1% en ↑Pi y ↓Pi, incubados a 37°C y 175 rpm. Se separó el sobrenadante de las células evitando cambiar la conformación de los compuestos y se midió directamente la absorbancia a las longitudes de onda asociadas a ellos. Esto también se realizó para los cultivos destinados a la incubación con los peces, los que se crecieron en medios NGM con ↑Pi y ↓Pi. Todas las mediciones se estandarizaron por la  $DO_{600}$  de los cultivos.

## **2.5. Detección de acil-homoserina lactonas (AHLs) en cultivos líquidos de *P. aeruginosa***

Con el fin de comparar la producción de AHLs entre las cepas mutantes de los genes *ppk1* y *ppk2* y la silvestre, se crecieron todas las cepas en medio NGM +glicerol1% con ↑Pi y ↓Pi en matraces Erlenmeyer de 1 L con 310 mL de cultivos ajustados a una  $DO_{600}=0,05$ , y se incubaron a 37°C y 175 rpm. Se tomaron alícuotas de 100 mL de cada cultivo a las 3, 6 y 10 horas de incubación para la extracción de AHLs, y en cada tiempo se midió la  $DO_{600}$  y la producción de pioverdina y piocianina.

### **2.5.1. Extracción orgánica de AHLs**

La extracción orgánica de AHLs de los cultivos se realizó según los métodos descritos anteriormente (34, 82), pero con algunas modificaciones para la extracción en cultivos no estacionarios de *P. aeruginosa*. Brevemente, se centrifugaron 100 mL de cultivo bacteriano a 3.300 g por 30 minutos para remover las bacterias y se extrajeron las AHLs del sobrenadante 3 veces con 0,5 volúmenes de diclorometano. Los extractos en diclorometano se secaron con sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y secaron por rotaevaporación a 50°C. Los residuos se disolvieron en acetato de etilo y se concentraron de forma que los extractos de los cultivos con menor densidad óptica se disolvieron en 500 µL y los demás se ajustaron en relación a su  $DO_{600}$ . Estas muestras se guardaron a -20°C hasta su separación cromatográfica.

### **2.5.2. Separación de los extractos orgánicos por cromatografía en capa fina**

Los extractos se separaron en placas cromatográficas con una matriz  $C_{18}$  de fase reversa (Merck) según lo descrito anteriormente (8, 110). En cada placa se pusieron estándares de distinto largo de cadena de 3-acil-homoserina lactonas y 3-oxo-acil-homoserina lactonas y 10 µL de cada muestra, y se corrieron 3 veces en metanol al 60% como fase móvil.



### **2.5.3. Ensayo de biosensor para la detección de AHLs**

Una vez corridas y secas las placas de cromatografía en capa fina (CCF) se revelaron con el biosensor de AHLs *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4), el cual carece del gen *traR* y presenta una fusión de los genes *lacZ* con *traG* en trans (34, 73, 110).

Para realizar el ensayo de biosensor se utilizó como inóculo un cultivo de noche en LB con gentamicina, diluyéndolo 100 veces en medio AB mínimo. El cultivo se incubó a 28-30°C por 8 horas con agitación, luego de lo cual se mezcló el cultivo con igual volumen de agar al 1%, se agregó X-gal (80 µg/mL) y se vertió de forma pareja sobre la CCF. Luego, se incubó protegido de la luz a 28-30°C por 48 horas.

### **2.6. Microarreglos fenotípicos**

Las cepas mutantes y silvestre de *P. aeruginosa* PAO1 crecidas en LB-agar fueron enviadas a Biolog® (EE.UU.) para el análisis. La metodología patentada consiste en crecer las bacterias en medios específicos distribuidos en placas de 96 pocillos, donde cada pocillo corresponde a un ensayo fenotípico. Los ensayos se realizaron con fuentes determinadas de carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, péptidos, osmolitos y pH (pruebas metabólicas), y medios con distintos compuestos químicos para evaluar la sensibilidad de las cepas. A estos medios se les agregó un compuesto llamado violeta de tetrazolio, el cual es un indicador de la respiración celular incoloro en su forma oxidada, y cambia de color a violeta al ser reducido por el NADH generado durante la respiración celular. Este cambio en el color en el medio es cuantificado en el tiempo con el equipo OmniLog™, lo que permite comparar el crecimiento de las cepas mutantes con la cepa control (silvestre)(10).

### **2.6.1. Análisis de los datos**

Los datos crudos de la respiración celular cuantificados mediante el cambio colorimétrico del violeta de tetrazolio, fueron normalizados por los valores de la cepa silvestre de forma que los valores mayores a 1 se consideraron como ganancias fenotípicas (el mutante creció más que el control), y los valores menores a 1 como pérdidas fenotípicas (el mutante creció menos que el control). Adicionalmente, se calculó el negativo del inverso multiplicativo de los valores menores a 1, para así obtener un valor que indique de mejor forma cuántas veces disminuyó el crecimiento de la cepa mutante en relación al control. Sólo se consideraron como significativos los valores mayores a 1,5 y menores a -1,5, es decir un aumento o una disminución en el crecimiento de un 50%. Con estos datos se realizaron análisis de agrupamiento con el programa Multiexperiment Viewer (MeV versión 4.6).

### **2.7. Comparación de los proteomas totales de las cepas de *P. aeruginosa* en distinta disponibilidad de fosfato**

Para comparar los cambios en la expresión de proteínas en la cepa silvestre de *P. aeruginosa* al enfrentarse a una carencia de fosfato, y en los mutantes de la síntesis de polifosfatos en la misma condición, se utilizó la técnica de marcaje isotópico de proteínas para analizar los proteomas totales de las cepas en las condiciones mencionadas.

#### **2.7.1. Preparación de los extractos totales de proteínas**

Las cepas fueron crecidas en medio NGM suplementado con 20 mM de fosfato inorgánico para la condición de exceso de Pi, y sin fosfato para la carencia de Pi. Se realizaron cultivos en triplicado en matraces de 500 mL con 100 mL de medio, inoculados a partir de un precultivo de noche en LB previamente lavado 3 veces con



medio NGM. Las réplicas se juntaron y se centrifugaron por medio hora a 3.300 g a temperatura ambiente. Se descartaron los sobrenadantes y los precipitados celulares se resuspendieron en 2 mL de la solución tampón de sonicación (Tris-HCl 50 mM). Éstos se traspasaron a tubos de 1,5 mL y se lavaron con la solución tampón 3 veces luego de centrifugar a 13.200 rpm a 4°C por 5 minutos. El precipitado se resuspendió en 0,8 mL de tampón de sonicación con inhibidor de proteasas (9 µL de PMSF 1 mM) y 10 µL de RNasa (10 mg/mL), y se lisaron las células mediante sonicación en hielo con 4 ciclos de 30 segundos con intervalos de detención del mismo tiempo, hasta que se eliminó la turbidez. Posteriormente, se agregaron 10 µL de DNasa (10 mg/mL) y se incubó en hielo por 10 minutos. La concentración de proteínas de la suspensión se midió por UV con un Nanofotómetro (con la celda LabelGuard™ Microliter, Protein-UV Mode, NanoPhotometer™ IMPLEN, Versión 2.1.). Luego, se precipitaron 800 µg de proteínas del extracto libre de células con el sistema Ready-Prep 2D Cleanup (Bio-Rad®, USA). Los precipitados secos de proteínas fueron guardados a -20°C y se enviaron al Centro Nacional de Biotecnología de Madrid (España) para su posterior análisis.

### **2.7.2. Análisis del proteoma total mediante marcaje isotópico**

El análisis de los proteomas fue realizado en la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología de Madrid, España. La técnica de proteómica cuantitativa desarrollada por este centro es el marcaje isotópico de proteínas (Isotope-Coded protein Labeling, ICPL) (90), la cual se basa en el marcaje diferencial de las muestras con el reactivo de ICPL (una muestra con el isótopo liviano y la otra con el pesado).

Las comparaciones realizadas en este estudio fueron: PAO1 silvestre en NGM ↓Pi vs. silvestre en ↑Pi, mutante *ppk1* en NGM ↓Pi vs. silvestre en ↓Pi, y mutante *ppk2* en NGM ↓Pi vs. silvestre en ↓Pi.

Para el ensayo, 100 µg de cada muestra fueron resuspendidos en una solución con urea 8 M y bicarbonato de amonio 25 mM, luego reducidos con reactivo de Cleland (DTT) y alquilados con iodoacetamida. La mezcla fue sometida a una electroforesis monodimensional en condiciones denaturantes (SDS-PAGE), y las bandas obtenidas se cortaron y se digirieron con tripsina a una razón de 20:1 incubándola toda la noche a 37°C. La digestión fue secada y luego de remover la urea se marcaron los péptidos con el isótopo liviano (silvestre en NGM ↓Pi) y el pesado (silvestre en NGM ↑Pi y mutantes *ppk1* y *ppk2* en NGM ↓Pi), y se mezclaron en proporciones iguales. Los péptidos obtenidos se identificaron por cromatografía líquida acoplada a ionización electrónica en forma de “spray” y cuantificados mediante espectrometría de masas en tándem (LC ESI-MS/MS). Los datos de las fracciones individuales fueron procesados mediante el programa DataAnalysis 3.4 (Broker Daltonics, Bremen, Alemania), y se fijó en un 5% la tasa de falsos descubrimientos (False Discovery Rate, FDR) a nivel péptidico. Para la identificación de las proteínas, el espectro MS/MS (como archivos genéricos de Mascot) fue cotejado con la base de datos de *P. aeruginosa* (<http://www.uniprot.org>). Se consideraron sólo aquellas proteínas cuantificadas con al menos dos péptidos y los datos se expresaron en Log<sub>2</sub> para visualizar mejor la variación de cada proteína con respecto a la situación control. Por último, se consideró como significativa la variación de una proteína cuando su tasa de cambio, expresada en Log<sub>2</sub>, fuera superior a +0,6 o inferior a -0,6 (90).

### **2.7.3. Análisis de los datos de proteómica**

Los cambios significativos encontrados fueron clasificados funcionalmente según la base de datos PseudoCAP de la página [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com) (133) y agrupados por categoría funcional según el código COG de cada proteína para *P. aeruginosa* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/grace/cogenome.cgi?q=287>), en función molecular,

proceso biológico y componente celular según “GO Term Finder” (<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/go.cgi>), agregando la categoría de factor de virulencia utilizando la base de datos de “Virulence Factors of Pathogenic Bacteria” (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>).

## **2.8. Evaluación de la patogenicidad de las distintas cepas bacterianas en el pez modelo *Danio rerio***

Con el fin de evaluar y comparar la virulencia de las cepas se desarrolló un método de infección no invasivo en el pez cebra (*D. rerio*), utilizando larvas de peces silvestres de la línea Tab5 que tiene el genoma secuenciado. Luego de la fecundación, los embriones se incubaron a 28°C en medio embrionario E3 (5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,33 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7) hasta las 72 horas post fecundación (hpf).

### **2.8.1. Método de infección por bacterias en el pez cebra**

El método de infección no invasivo desarrollado para el pez cebra consiste en incubar directamente los peces en una suspensión bacteriana de alta densidad óptica. Para esto, los peces de 72 hpf se lavaron 3 veces con medio E3 estéril y se incubaron a 18-22°C por lo menos una hora antes de agregarle las bacterias.

Para este ensayo se utilizaron las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 silvestre, los mutantes *ppk1* y *ppk2*, y *E. coli* DH5α a modo de control. De cada cepa se hicieron cultivos de noche en medio LB con tetraciclina 50 μM para los mutantes *ppk1* y *ppk2*. Los precultivos se lavaron 3 veces con medio NGM fresco suplementado con fosfato y sin fosfato según corresponda. Luego, 500 μL de cada uno se utilizaron como inóculo para 50 mL de cultivos NGM con y sin fosfato, los que fueron crecidos por 18 horas a 37°C y 170 rpm. Se centrifugaron 40 mL de cada cultivo por 30 min a 15000 rpm y el precipitado celular se resuspendió en medio E3 estéril, luego se midió la DO<sub>600</sub>



ajustándose posteriormente a 1,4. Se tomaron alícuotas de cada suspensión para luego calcular el título en LB agar sin antibióticos.

La incubación con bacterias se realizó en placas plásticas de 6 pocillos, los cuales contenían 10 larvas cada uno en 3 mL de E3 estéril. A cada pocillo se le agregaron 3 mL de las suspensiones bacterianas con  $DO_{600} = 1,4$ , quedando una  $DO_{600}$  final de 0,7 correspondientes a alrededor de  $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), o de E3 en caso del control, y se incubaron a 18-22°C. Los experimentos se realizaron en 6 réplicas biológicas en semanas diferentes.

### **2.8.2. Monitoreo de la infección y curvas de sobrevivencia**

Los peces se inspeccionaron visualmente cada una hora para contabilizar los eventos de muerte, definidos como el cese total del movimiento cardiaco, y cualquier cambio en el comportamiento o fisiología normal de las larvas. Los cambios característicos fueron registrados con fotografías tomadas con una lupa Olympus y un aumento de 1,6X, luego de varios lavados en E3.

Con estas observaciones se creó una escala de infección, basada en estudios de infecciones virales en larvas de pez cebra (72), donde se clasifica la salud de las larvas basándose en signos macroscópicos de la infección que siguen un patrón predecible, partiendo de larvas normales (estado 3) que pierden capacidad de nado (estado 2), la reacción refleja al tacto, cambios en el flujo sanguíneo o frecuencia cardiaca (estado 1), hasta la muerte (estado 0). Luego de registrar el número de larvas muertas incubadas por 28 horas para cada cepa bacteriana, se realizaron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier donde los eventos de muerte se visualizan en una función escalonada. Estas curvas fueron realizadas con el programa GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California, USA).



### 3. RESULTADOS

Debido a la gran variabilidad fenotípica encontrada en aislados de *P. aeruginosa* (47, 58), se estudiaron las características macroscópicas de la cepa silvestre y los mutantes *ppk1* y *ppk2* mediante ensayos fenotípicos.

#### 3.1. Selección de las condiciones de crecimiento

Con el fin de observar fenotipos relacionados con factores de virulencia, se utilizaron medios de cultivo en los cuales puede modificarse fácilmente la cantidad de fosfato. Estudios realizados por el grupo de Alverdy y cols. (71, 137) determinaron que la carencia de fosfato genera un aumento en la virulencia de *P. aeruginosa* en el nematodo *Caenorhabditis elegans* y ratones sometidos a cirugía, lo que se traduce en sepsis intestinal y muerte. En ambos modelos animales, la muerte es producida por un fenotipo hipervirulento de *P. aeruginosa* provocado por la baja cantidad de fosfato disponible, y se relaciona con un aumento en la producción de factores de virulencia como la lectina PA-I, sideróforos como la pioverdina y el pigmento tóxico piocianina. Por estas razones, decidimos utilizar el medio de cultivo descrito para el crecimiento de *P. aeruginosa* en los ensayos con *C. elegans*, llamado medio NGM (Nematode Growth Media). A diferencia de los medios de crecimiento convencionales como el LB, el medio NGM puede ser fácilmente adaptado a una condición de exceso de fosfato (agregando un tampón K-Ph que contiene 25 mM de fosfato inorgánico), y una de carencia de fosfato (sin el tampón K-Ph) donde la única fuente de fosfato es orgánica y proviene de la peptona (Bacto peptona, Difco®) que se agrega al medio como fuente de carbono. Este medio además se utilizó como caldo sin agregarle el agar, y en los casos en que se requirió un mayor crecimiento de las bacterias, se complementó con

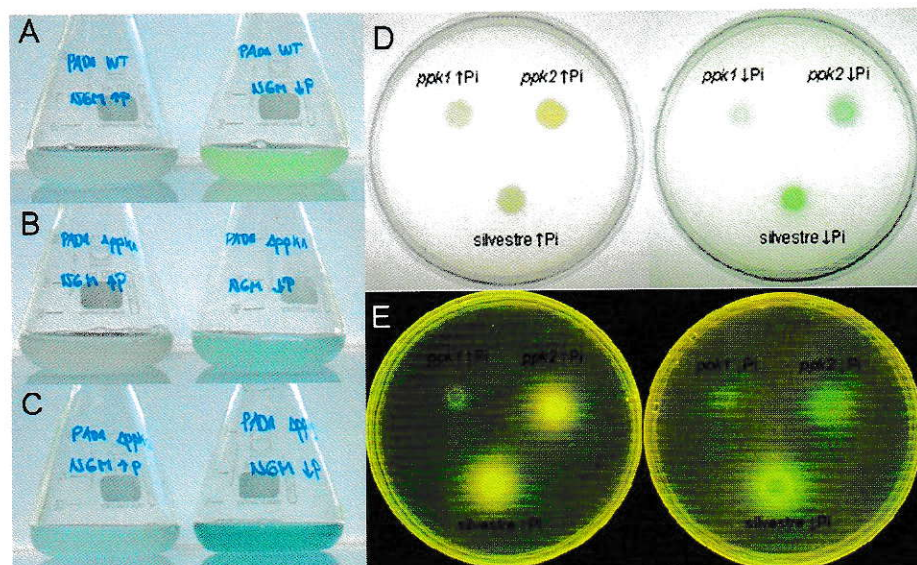
glicerol al 1%. Al crecer las distintas cepas de *P. aeruginosa* en estos medios se observó la coloración característica de los pigmentos tóxicos que la bacteria produce en carencia de Pi, lo que no ocurrió en el medio LB. Por esta razón, todas las cepas fueron crecidas en este medio con alto fosfato (NGM ↑Pi) y con bajo fosfato (NGM ↓Pi) para evaluar sus características fenotípicas.

### **3.2. Caracterización fenotípica de los mutantes de la síntesis de polifosfatos (*ppk1* y *ppk2*) en *P. aeruginosa* PAO1**

#### **3.2.1. Crecimiento bacteriano y morfología macroscópica**

Luego de crecer las distintas cepas en medio NGM con y sin fosfato por 18 horas, se observó la aparición de color en los cultivos con bajo fosfato, lo cual corresponde a la producción de pigmentos característicos de *P. aeruginosa*. El color más intenso corresponde al mutante *ppk2* con un verde azulado, mientras que el mutante *ppk1* presenta un color celeste, muy distinto a la cepa silvestre que se ve de un amarillo (Figura 6A-C). Esto también se observa en el medio sólido pero la coloración es más tenue, sin embargo al iluminar las placas con luz ultra violeta se observa fluorescencia debida a pigmentos en el mutante *ppk2* y en la cepa silvestre en ambas condiciones (Figura 6D y E).

Luego, para evaluar el crecimiento de las cepas en condiciones de alto y bajo fosfato, se realizaron curvas de crecimiento en NGM suplementado con 1% de glicerol, ya que el medio NGM sólo es insuficiente para soportar el crecimiento bacteriano en este tipo de experimentos.

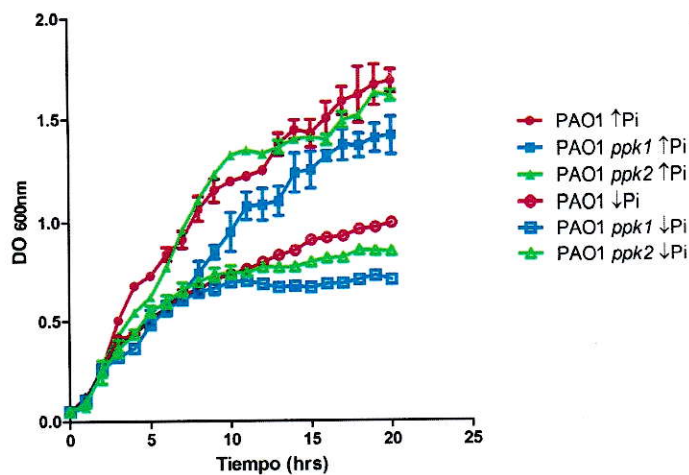


**Figura 6. Cultivos líquidos (A, B y C) y sólidos (D y E) en medio NGM suplementado alto fosfato ( $\uparrow$ Pi) y bajo fosfato ( $\downarrow$ Pi).** Precultivos en medio LB de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 silvestre (A), mutante *ppk1* (B) y mutante *ppk2* (C), se utilizaron como inóculo para el crecimiento en ambos medios. En las figuras D y E se muestran las mismas placas bajo luz normal y luz ultravioleta, respectivamente.

Para realizar las curvas se midieron las  $DO_{600}$  cada una hora (Figura 7). Tal como se esperaba, todas las cepas presentaron un menor crecimiento en el medio con carencia de fosfato lo que se traduce en una menor tasa de crecimiento y mayor tiempo generacional en el medio carente de fosfato (Tabla 2), además de un menor tiempo para llegar a la fase estacionaria que las mismas cepas en alto fosfato.

También se comprobó la deficiencia en el crecimiento de la cepa mutante en el gen *ppk1* (64) que mostró un menor crecimiento en ambos medios al compararla con la cepa silvestre. Interesantemente, la cepa mutante *ppk2* no muestra tanta diferencia en su crecimiento al compararla con la cepa silvestre. Esto se observa al comparar la tasa de crecimiento de ambas cepas, la cual difiere un 4,5% en el medio con alto fosfato, y un 2,2% en el medio con bajo fosfato (Tabla 2).





**Figura 7. Curva de crecimiento de las cepas en estudio en medio NGM +glicerol 1%, en carencia y exceso de fosfato (↑Pi y ↓Pi respectivamente).** Las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 se crecieron en medio NGM suplementado con glicerol al 1% como fuente de carbono, con y sin fosfato inorgánico disponible (↑Pi y ↓Pi), a 37°C y 175 rpm, a partir de cultivos frescos de noche en LB ajustados a una  $DO_{600} = 0,05$ . Se siguió el crecimiento celular midiendo la  $DO_{600}$  cada una hora. Los experimentos se realizaron en triplicado y se muestra el promedio  $\pm$  error estándar.

En estos ensayos se observó la aparición de color entre las 4 y 5 horas de incubación en la condición de bajo fosfato en las cepas silvestre y mutante *ppk2*, y además este mutante presentó coloración a partir de las 7 horas de incubación en alto fosfato.

**Tabla 2. Tasa de crecimiento y tiempo generacional de las cepas mutantes y la silvestre.** Se muestra el promedio  $\pm$  error estándar de tres mediciones independientes entre las 2 y 5 horas de incubación. Las diferencias estadísticamente significativas entre los mutantes y la cepa silvestre, encontradas mediante un ANOVA de dos vías y el post-test de Bonferroni, se muestran con un asterisco, correspondientes a un  $P < 0,05$ .

Cepa	Tasa de crecimiento ( $DO_{600}/hr$ )		Tiempo generacional (hr)	
	↑Pi	↓Pi	↑Pi	↓Pi
<b>PAO1 silvestre</b>	$0,776 \pm 0,017$	$0,725 \pm 0,0058$	$0,894 \pm 0,02$	$0,956 \pm 0,0076$
<b>PAO1 <i>ppk1</i></b>	$0,686 \pm 0,037$	$0,6 \pm 0,046$ (*)	$1,016 \pm 0,056$	$1,171 \pm 0,097$ (*)
<b>PAO1 <i>ppk2</i></b>	$0,741 \pm 0,04$	$0,709 \pm 0,017$	$0,941 \pm 0,054$	$0,979 \pm 0,024$

↑Pi: medio NGM +glicerol 1% con alto Pi  
 ↓Pi: medio NGM +glicerol 1% con bajo Pi



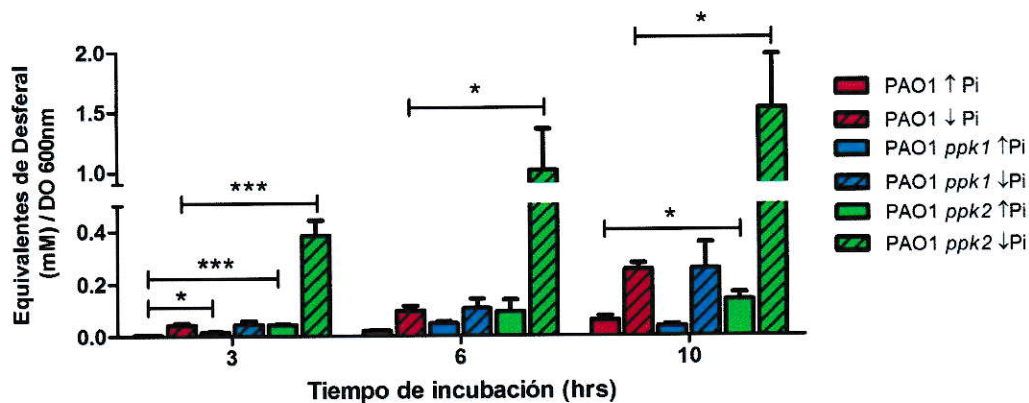
### 3.2.2. Evaluación de la producción de sideróforos

Como una primera aproximación, se buscó evaluar la producción de todos los sideróforos sintetizados por *P. aeruginosa*. Para esto se utilizó el ensayo de difusión en agar CAS para fluidos biológicos descrito por Shin y cols. (112), el cual se basa en la capacidad de los sideróforos de quelar hierro del medio circundante. Con este se realizaron curvas de calibración y se midió la concentración de sideróforos en equivalentes de Desferal, normalizado por la  $DO_{600}$  (Materiales y Métodos, Figura 3). El ensayo se realizó con el sobrenadante de cultivos de 3, 6 y 10 horas de incubación, en medios con alto y bajo  $P_i$ .

Mediante un ANOVA de dos vías para mediciones repetidas se determinó que el tiempo de incubación afecta la producción de sideróforos ( $P=0,0003$ ), y que la producción difiere entre las cepas ( $P<0,0001$ ). Además, la interacción entre las variables tiempo de incubación y cepa se considera muy significativa ( $P=0,0017$ ), lo que se relaciona con la observación de que a mayor tiempo de incubación aumenta la cantidad de sideróforos totales.

De forma general se observó una mayor producción de sideróforos en la condición de bajo  $P_i$ , la cual fue estadísticamente significativa para todas las cepas (cepa silvestre  $P=0,0002$ , mutante *ppk1*  $P=0,0463$  y mutante *ppk2*  $P=0,0112$ ).

Por otro lado, se comparó la producción de sideróforos de las cepas mutantes con la cepa silvestre mediante un ANOVA de una vía para cada tiempo de incubación por separado, tanto en alto como en bajo  $P_i$  (Figura 8), y se evaluó a qué mutante correspondía la mayor varianza (y por tanto difiere más de la cepa silvestre) mediante un post-test de comparaciones múltiples de Tukey. En alto  $P_i$ , ambos mutantes presentaron una mayor producción de sideróforos que la cepa silvestre a las 3 horas de incubación, y sólo el mutante *ppk2* a las 10 horas.



**Figura 8. Medición de sideróforos totales en cultivos líquidos de las distintas cepas de *P. aeruginosa* mediante el ensayo de difusión en placas CAS.** Comparación de la producción de sideróforos en las cepas mutantes *ppk1* y *ppk2* y PAO1 silvestre, normalizado como equivalentes de desferal/DO<sub>600</sub>. Los gráficos muestran mediciones a las 3, 6 y 10 horas de incubación de las distintas cepas en medio NGM +glicerol 1% con alto Pi (barras sólidas) y con bajo Pi (barras achuradas). Cada punto representa el promedio de cuatro ensayos ± error estándar. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas obtenidas a partir de un ANOVA de una vía con un post-test de comparaciones múltiples de Tukey, al comparar las cepas mutantes con la silvestre para cada condición de Pi en cada tiempo.

En bajo Pi no se encontraron diferencias significativas entre el mutante *ppk1* y el silvestre en ninguno de los tiempos evaluados. Sin embargo, en esta condición de fósforo el mutante *ppk2* mostró una mayor producción de sideróforos a las 3, 6 y 10 horas de incubación ( $P < 0,0001$ ,  $P < 0,05$  y  $P < 0,05$  respectivamente, Figura 8), siendo superior a la cepa silvestre y al mutante *ppk1*.

### 3.2.3. Medición espectrofotométrica de los factores de virulencia pioverdina y piocianina

Debido a que el ensayo de detección en placas CAS responde a todos los compuestos capaces de quelar hierro, fue necesario utilizar un método capaz de distinguir entre los distintos sideróforos producidos por *P. aeruginosa* basándose en la diferencia de coloración de ellos para utilizar técnicas espectrofotométricas. Sin

embargo, el único sideróforo disponible comercialmente es la pioverdina (Sigma Aldrich®) por lo que sólo se realizaron los ensayos para esta, además de la fenazina pigmentada piocianina (Sigma Aldrich®). Como los medios de cultivo utilizados fueron modificados de forma de minimizar los metales disueltos e impedir la oxidación o reducción de los compuestos, se asumió que la pioverdina se encontraría disuelta en su forma reducida la cual es de color verde, estado en el cual puede ser medida en el espectro visible (3), y que la piocianina se encontraría en su forma oxidada (azul), ya que la ausencia de sustratos oxidables impide su reducción al producto incoloro leucopiocianina (17). Para medir directamente la absorbancia de estos metabolitos en el medio de cultivo seleccionado, sin realizar una extracción orgánica previa como se ha descrito para la identificación de estos sideróforos (75, 122, 136), se hicieron barridos espectrofotométricos de los dos estándares puros disueltos en los distintos medios de cultivo que se utilizaron en este estudio (Materiales y métodos, Figura 4).

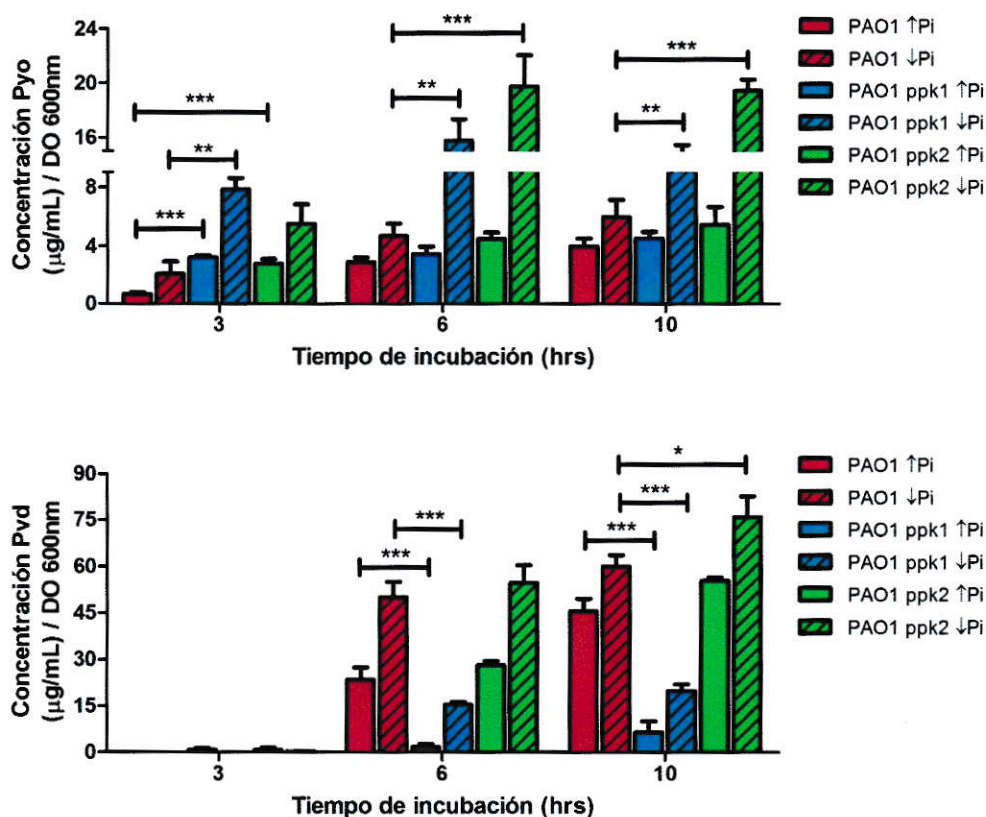
Posteriormente, se realizaron curvas de calibración para ambos metabolitos en los medios de cultivo descritos para determinar de forma cuantitativa la producción de las distintas cepas (Materiales y métodos, Figura 5).

La determinación de la presencia de la pioverdina y la piocianina se realizó en las mismas condiciones y con los mismos cultivos con los que se hizo el ensayo de difusión en agar CAS. Luego de tomar alícuotas de los cultivos a las 3, 6 y 10 horas de incubación, se removieron las células y se midió la absorbancia de los sobrenadantes a las longitudes de onda señaladas para cada medio.

En concordancia con lo observado en los ensayos de difusión en agar CAS, la producción de pioverdina se incrementó en la condición de carencia de fosfato (Figura 9). Tanto en la cepa silvestre como en el mutante *ppk2* se observó un aumento de alrededor de dos veces de la producción de pioverdina a partir de las 6 horas de



incubación, siendo mayor la producción de pioverdina en el mutante *ppk2* que en el silvestre en bajo Pi a las 10 horas de incubación ( $P<0,05$ ). En el mutante *ppk1* se observó una disminución de la producción de pioverdina a las 6 y 10 horas de incubación en comparación con la cepa silvestre, tanto en el medio con alto Pi como en bajo Pi ( $P<0,0001$  para todos los casos, Figura 9).



**Figura 9. Medición espectrofotométrica de piocianina y pioverdina en sobrenadantes de cultivos de las cepas mutantes y silvestre de *P. aeruginosa* PAO1.** Las cepas se crecieron en medio NGM+glicerol 1% con alto fosfato (barras sólidas) y bajo fosfato (barras achuradas). Las mediciones de absorbancia de los sobrenadantes a las 3, 6 y 10 horas de incubación, se transformaron a concentración de piocianina (arriba) y de pioverdina (abajo) y se normalizaron por la  $\text{DO}_{600}$ . Cada punto corresponde al promedio de cuatro mediciones  $\pm$  error estándar. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas encontradas a partir de un ANOVA de una vía con un post-test de comparaciones múltiples de Tukey, al comparar las cepas mutantes con la silvestre para cada condición de Pi en cada tiempo.



Por otro lado, se observó que la producción de piocianina en todas las cepas en alto fosfato no difiere significativamente luego de las 6 horas de incubación. En bajo fosfato la producción de piocianina fue mayor que en alto Pi en todas las cepas, pero fueron las cepas mutantes las que tuvieron mayor cantidad de este compuesto, ya que aumentaron su producción entre 2 a 4 veces. Además, en esta condición se acrecentaron las diferencias con la cepa silvestre, ya que la producción de los mutantes fue significativamente mayor a las 6 y 10 horas de incubación ( $P < 0,001$  para el mutante *ppk1* y  $P < 0,0001$  para el mutante *ppk2*, Figura 9).

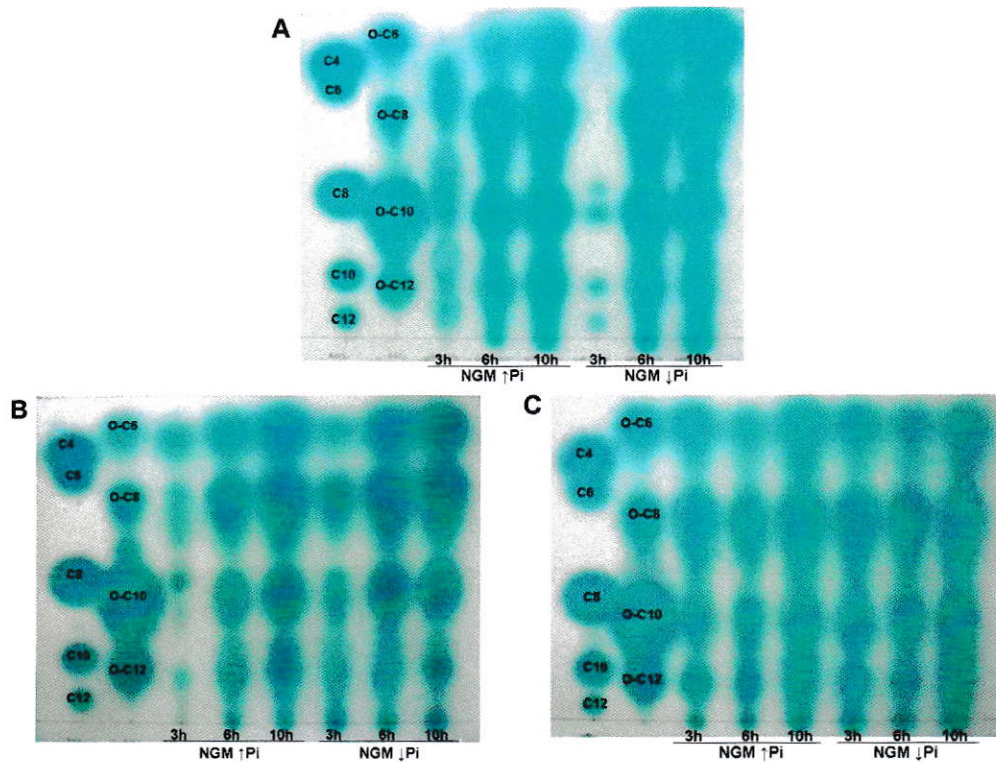
#### **3.2.4. Comparación de la producción de moléculas autoinducoras de tipo acil-homoserina lactonas en las distintas cepas de *P. aeruginosa* PAO1**

Para evaluar la producción de AHLs en distintas etapas del crecimiento bacteriano y en relación a la cantidad de fosfato disponible, se utilizó el ensayo de detección dependiente del biosensor *A. tumefaciens* NTL4.

Inesperadamente, se observaron entre 4 y 7 señales (dependiendo de la condición y la cepa) correspondientes a lactonas de distinto largo de cadena, algunas de las cuales tienen señales que se corresponden con los estándares de 3-oxo-C<sub>n</sub>-HSL y de otras lactonas sin sustitución. Sin embargo, muchas señales no coinciden con los estándares de largo de cadena utilizados y por lo tanto no se pueden identificar. De las lactonas endógenas de *P. aeruginosa* es posible identificar en todos los extractos la molécula 3-oxo-C12-HSL, sin embargo no se observa una señal clara y separada que pueda corresponder a la C4-HSL.

En la cepa silvestre se observó una cantidad e intensidad de las manchas similar a las 6 y 10 horas de incubación en ambas concentraciones de fosfato. A las 3 horas de incubación la mayor producción de AHLs se observó en la condición de exceso de

fosfato, correspondiente a una mayor intensidad y área de las manchas, lo que no se repite en las demás cepas. Contrariamente, en el mutante *ppk1* se observaron manchas de mayor intensidad y área en carencia de fosfato a las 3 horas de incubación, y en el mutante *ppk2* las manchas son similares en ambas condiciones. En esta última cepa tampoco se observan diferencias en la producción de lactonas en las distintas fases de crecimiento evaluadas, encontrándose una alta producción de estas moléculas en todas las condiciones.



**Figura 10. Detección de *N*-acil homoserina lactonas en sobrenadantes de cultivos de *P. aeruginosa* PAO1 por cromatografía de capa fina. (A) Extractos de la cepa silvestre, (B) de la cepa mutante *ppk1* y (C) del mutante *ppk2*. Las muestras se obtuvieron por extracción orgánica de sobrenadantes de cultivos en medio NGM+glicerol 1% con y sin fosfato ( $\uparrow$ Pi y  $\downarrow$ Pi) a las 3, 6 y 10 horas de incubación. Los extractos fueron revelados en placas cromatográficas de capa fina C18 de fase reversa, corridas en una mezcla de metanol/agua (60:40 v/v), y reveladas con el biosensor *A. tumefaciens* NTL4. El primer carril corresponde a los estándares de acil-HSL, el segundo a los de 3-oxo-acil-HSL y los demás a las muestras. Los largos de la cadena acilo de los estándares se muestran para cada compuesto.**

### **3.3. Ensayos fenotípicos a gran escala**

Debido a que los cambios metabólicos ocasionados por las mutaciones en la síntesis de los polifosfatos generan efectos en varios de los fenotipos observados, es posible que muchos otros fenotipos también se vean afectados producto de estas mutaciones. Es por esto que se vuelven útiles los ensayos a gran escala, como una forma de rastreo masivo de nuevos posibles fenotipos asociados a la alteración de la síntesis de los poliP. Para esto se tomaron dos enfoques, uno celular mediante el uso de microarreglos fenotípicos, y otro molecular utilizando proteómica cuantitativa.

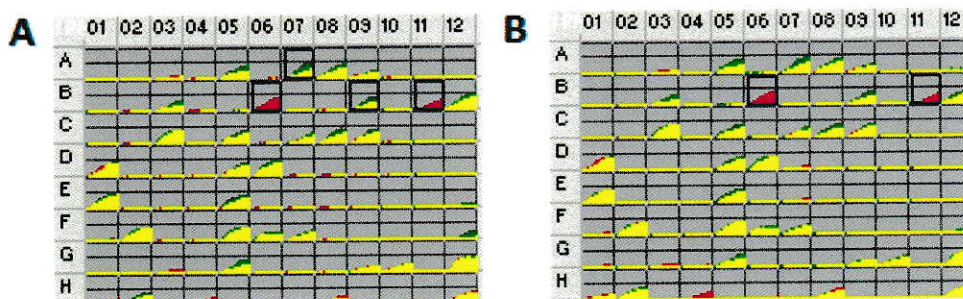
#### **3.3.1. Microarreglos fenotípicos de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1**

Los microarreglos fenotípicos permiten evaluar simultáneamente cerca de dos mil fenotipos celulares, lo que en este caso fue utilizado para comparar el efecto de las mutaciones en el metabolismo de síntesis de los polifosfatos en *P. aeruginosa* PAO1. Para ello se comparó el crecimiento de las cepas mutantes con el control en distintas fuentes de carbono, nitrógeno y fuentes peptídicas de nitrógeno, fósforo y azufre, en distintas condiciones de osmolaridad y pH, y frente a distintos compuestos químicos como antibióticos.

Los resultados se muestran como el consenso de dos réplicas separadas de gráficos cinéticos del crecimiento bacteriano, donde se compara la curva de la cepa silvestre (rojo) con el mutante (verde). Estos ensayos se distribuyen en placas de 96 pocillos las cuales se denominan placas PM y se les asigna un número del uno al veinte según el compuesto a probar. Un ejemplo de esto se muestra para las placas de utilización de fuentes de carbono para ambos mutantes (Figura 11). Los sustratos donde hubo un mayor crecimiento de la cepa silvestre se muestran en rojo y representan una pérdida fenotípica, y el mayor crecimiento de los mutantes en verde



indica una ganancia fenotípica, la porción donde se sobreponen las dos curvas se muestra en amarillo. Los cambios significativos están enmarcados en negro.



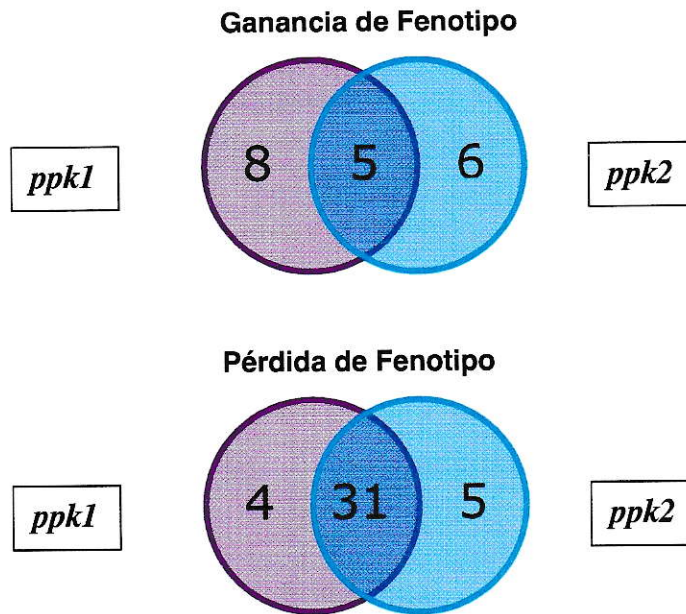
**Figura 11. Resultados cinéticos de la placa PM1 de fuentes de carbono de los Microarreglos Fenotípicos de Biolog.** Las ganancias fenotípicas de los mutantes se observan en verde, las pérdidas en rojo y la superposición de las curvas en amarillo. Los cambios significativos entre las cepas se muestran con un cuadrado negro. (A) Comparación entre el mutante *ppk1* y la cepa silvestre. (B) Comparación entre el mutante *ppk2* y la cepa silvestre.

En una visión general de los resultados se observa que ambas cepas mutantes se comportan de forma similar tanto en la utilización de nutrientes (PM1-10) como en la sensibilidad a compuestos químicos (PM11-20), observándose una mayor cantidad de pérdidas fenotípicas que ganancias (Figura 12). Al hacer una comparación *in silico* de los mutantes se observan sólo dos diferencias fenotípicas, una ganancia de fenotipo del mutante *ppk1* en relación al *ppk2* en un catión tóxico de la placa PM16A (cloruro férrico), y una pérdida en la misma placa frente al compuesto diamida.

Para visualizar mejor los datos de los microarreglos se separaron en pruebas metabólicas (PM1-10) y pruebas de sensibilidad (PM11-20), y se realizaron análisis de agrupamiento con el programa MultiExperiment Viewer versión 4.6. Para esto se utilizaron los datos metabólicos de respiración celular para cada placa y se normalizaron dividiendo los valores de los mutantes con la cepa silvestre para cada fenotipo. Los valores mayores a 1,5 se consideraron como ganancias fenotípicas

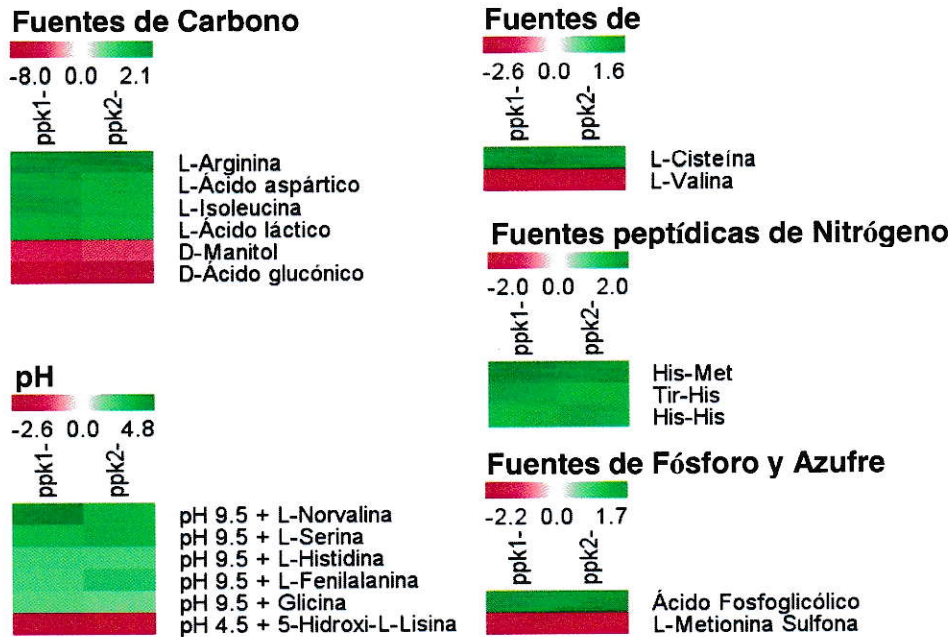


(correspondientes a los gráficos cinéticos con color verde), y a los valores menores a 1 se les calculó el inverso multiplicativo y se consideraron los valores menores a -1,5 como pérdidas fenotípicas (de color rojo en los gráficos cinéticos).



**Figura 12. Diagramas de Venn de la comparación de resultados de los Microarreglos Fenotípicos para las cepas mutantes *ppk1* y *ppk2* con la cepa silvestre.** Arriba, ganancia de fenotipo de las cepas mutantes *ppk1* y *ppk2* en relación con la silvestre. Abajo, pérdida de fenotipo. En la intersección se muestran los fenotipos comunes para ambos mutantes.

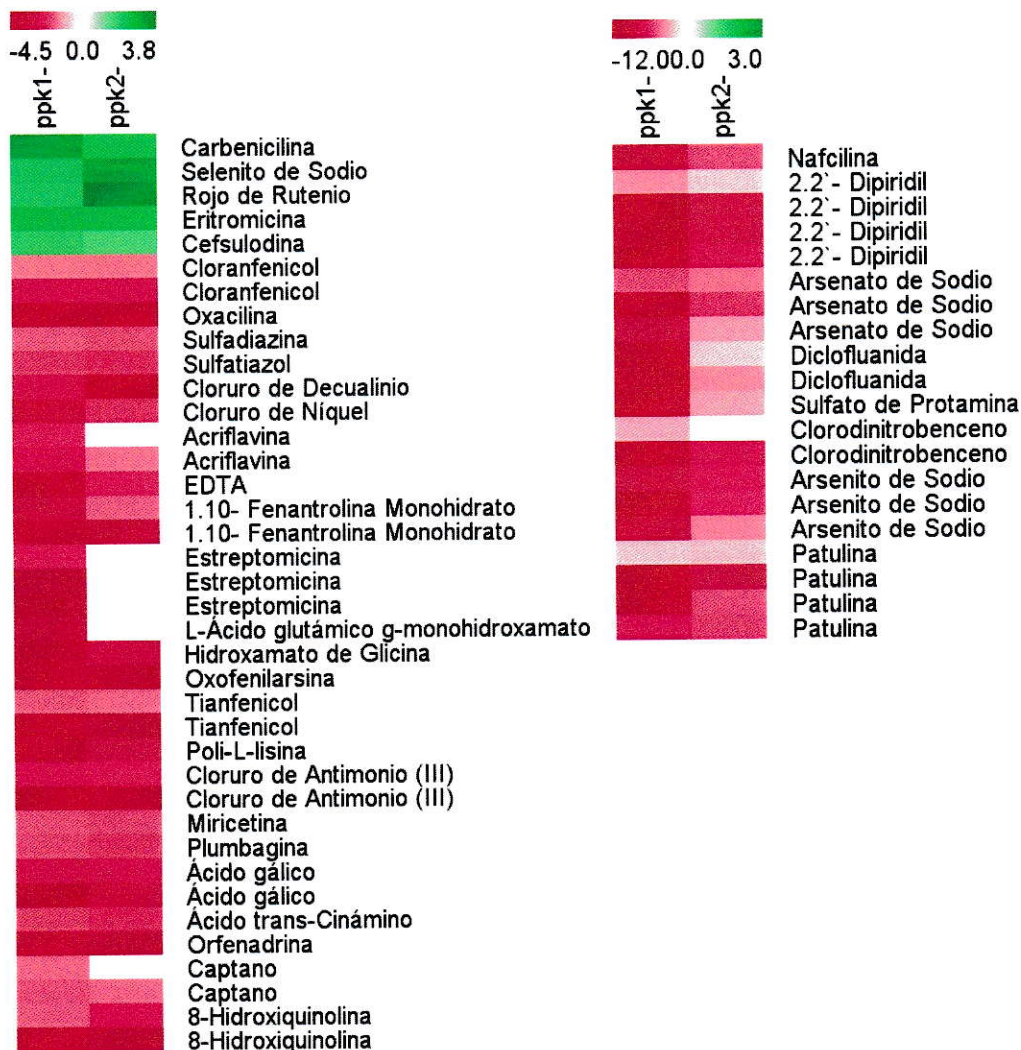
En la Figura 13 se representan los agrupamientos de las placas de pruebas metabólicas para ambos mutantes. En ellos se observa una mayoría de ganancias fenotípicas (en verde) donde el comportamiento de los mutantes es similar, con excepción de algunos compuestos como el ácido aspártico, la isoleucina y el ácido láctico, donde la intensidad de color es mayor para el mutante *ppk1* lo que indica que la ganancia de fenotipo para esta cepa es mayor.



**Figura 13. Representación de los perfiles fenotípicos obtenidos por análisis de agrupamiento para las pruebas metabólicas en los mutantes *ppk1* y *ppk2* con respecto a la cepa silvestre.** Pruebas metabólicas corresponden a las placas PM1-10 de los Microarreglos Fenotípicos (Biolog®). Los datos se muestran como una razón de cambio entre las cepas mutantes y la silvestre, y se utilizaron sólo aquellos donde el cambio fuera mayor a 1,5 veces o menor a -1,5 veces. Las ganancias fenotípicas (valores positivos) se muestran en verde y las pérdidas fenotípicas (valores negativos) en rojo. Los análisis fueron realizados con el Software Multiexperiment Viewer (MeV versión 4.6).

En el caso de las placas de sensibilidad (Figura 14) hay tan solo 5 ganancias fenotípicas en ambos mutantes, y 53 pérdidas fenotípicas en el mutante *ppk1*, y 46 en el mutante *ppk2*, lo que claramente indica una mayor sensibilidad de estas cepas frente a compuestos tóxicos. Sin embargo, en la mayoría de los casos el mutante *ppk1* presenta un menor crecimiento que el otro mutante, lo que se refleja en una mayor intensidad en la coloración de los agrupamientos. Inclusive, hay compuestos como la estreptomycin (aminoglucósido) donde no se observaron cambios significativos en el crecimiento de la cepa mutante *ppk2* con respecto de la silvestre, y el mutante *ppk1* presenta sensibilidad a tres concentraciones de este compuesto.

### Sensibilidad a compuestos químicos



**Figura 14. Análisis de agrupamiento para las pruebas de sensibilidad a compuestos químicos de las cepas mutantes *ppk1* y *ppk2* con respecto a la cepa silvestre.** Pruebas de sensibilidad (placas PM11-20) de los Microarreglos Fenotípicos (Biolog®). Los datos se muestran como una razón de cambio entre las cepas mutantes y la silvestre, y se utilizaron sólo aquellos donde el cambio fuera mayor a 1,5 veces o menor a -1,5 veces. Los compuestos repetidos representan distintas concentraciones, siendo la primera la más baja. Las ganancias fenotípicas (valores positivos) se muestran en verde y las pérdidas fenotípicas (valores negativos) en rojo. Los compuestos que generan mayor pérdida fenotípica se muestran a la derecha. Los análisis fueron realizados con el Software Multiexperiment Viewer (MeV versión 4.6).



### **3.3.2. Comparación de los proteomas totales mediante proteómica cuantitativa**

Los cambios metabólicos generados producto de las mutaciones pueden visualizarse como una expresión diferencial de las proteínas en los mutantes estudiados, lo que puede ser cuantificado con la técnica de ICPL al comparar la abundancia relativa de los péptidos presentes en las muestras de los proteomas totales.

En primera instancia se quiso evaluar el efecto de la carencia de fosfato en las células de *P. aeruginosa* PAO1 silvestre, para lo cual se compararon los extractos proteicos de la bacteria crecida en carencia de Pi con la misma en exceso de Pi. Luego, se realizaron experimentos comparativos entre las cepas mutantes *ppk1* y *ppk2* con la cepa silvestre, crecidas en carencia de fosfato. En los resultados de los análisis comparativos (Tabla 3) se muestra el número de proteínas con variación significativa, es decir, aquellas cuya expresión [ $\text{Log}_2$  (promedio-mediana)] fuera igual o mayor a 0,6, o igual o menor a -0,6, y hayan sido cuantificados al menos dos péptidos de cada proteína. Esto implica que las proteínas que se encuentran en una sola condición no se consideran en el análisis debido a que su variación es infinita. La diferencia entre el promedio y la mediana permite hacer una corrección estadística del valor obtenido en el promedio. Las proteínas que presentaron variación en las células con bajo Pi corresponden al 30% del total de las proteínas identificadas en esta comparación (Tabla 3). Por otro lado, al comparar el efecto de las mutaciones en carencia de fosfato se observó que las proteínas con variación significativa corresponden al 26% para el mutante *ppk1* y al 21% para el mutante *ppk2*. En total, se identificaron 211 proteínas que se expresan de forma distinta en los mutantes de la síntesis de los polifosfatos en relación a la cepa silvestre en bajo Pi.



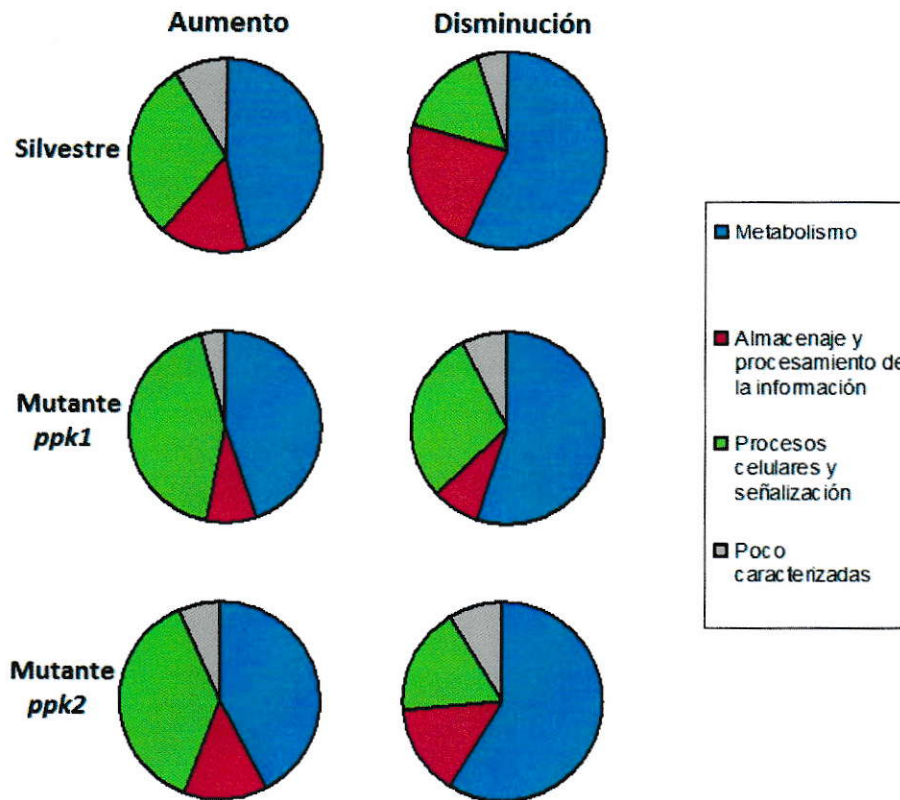
**Tabla 3. Resumen de los análisis de proteómica cuantitativa para las distintas cepas de *P. aeruginosa* PAO1.**

Comparación	Péptidos Totales	Péptidos Cuantificados	Proteínas identificadas	Proteínas con variación
PAO1↓Pi / PAO1↑Pi	3.602	2.054	414	125
<i>ppk1</i> ↓Pi / PAO1↓Pi	2.816	1.818	372	98
<i>ppk2</i> ↓Pi / PAO1↓Pi	5.096	2833	528	113

Los resultados de los análisis de proteómica cuantitativa se clasificaron según las bases de datos disponibles en PseudoCAP [[www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)] (133)] y las clasificaciones filogenéticas de las proteínas en los COGs (Cluster of Orthologous Groups). De la última, se utilizaron las categorías funcionales para la clasificación de las proteínas identificadas, agrupándolas en metabolismo, procesos celulares y señalización, almacenaje y procesamiento de la información, y las poco caracterizadas. Cada una de estas categorías se subdividió en otras basándose en las categorías COG y en otra base de datos de factores de virulencia (VFDB, Virulence Factors of Pathogenic Bacteria).

Los datos clasificados en categorías principales se muestran en la Figura 15, y las subcategorías en la Figura 16. En la primera se observa que la categoría funcional que explica el mayor porcentaje de cambio es el metabolismo, en todas las cepas y condiciones de crecimiento, y le sigue el almacenaje y procesamiento de la información, excepto en los casos de disminución de la expresión de proteínas en la cepa silvestre y mutante *ppk2*.

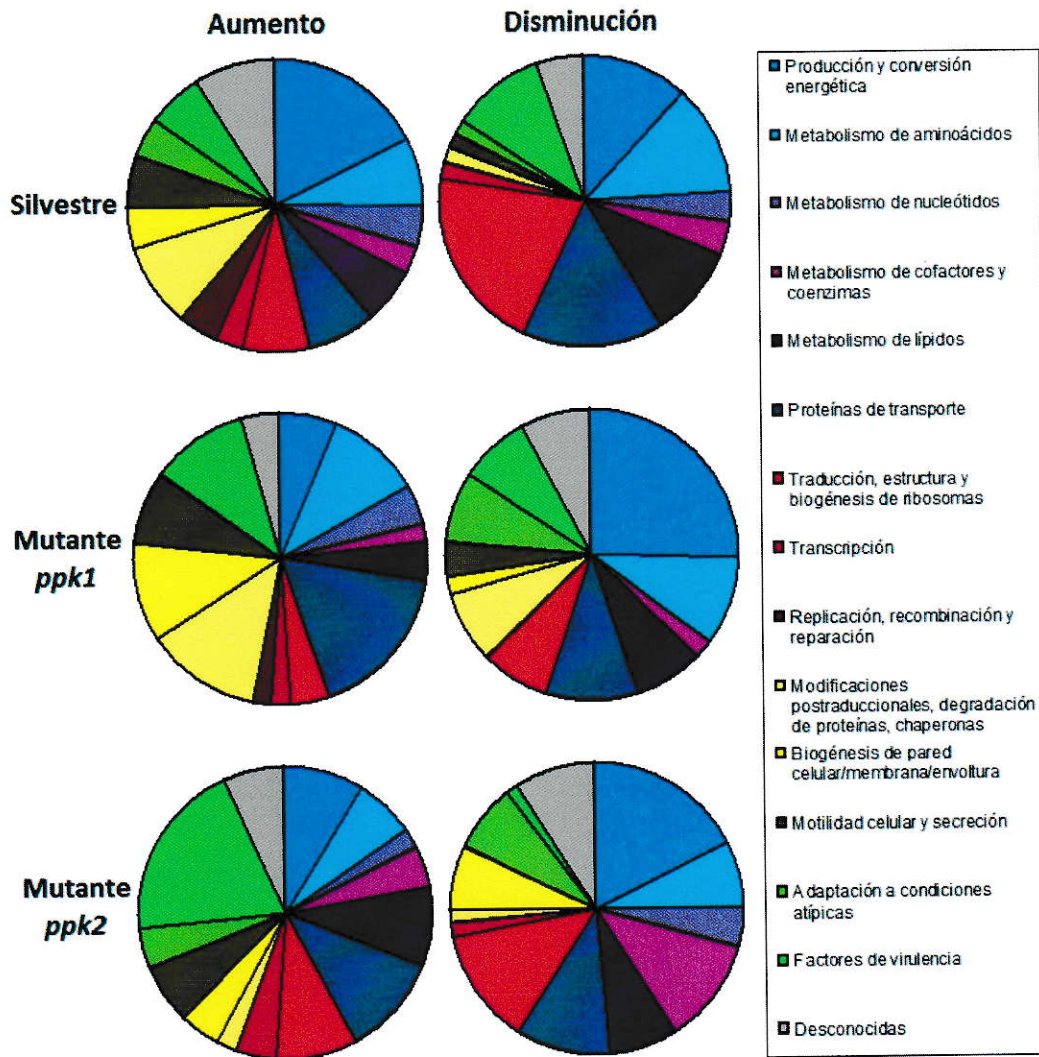
Por otro lado, la distribución de porcentajes en las categorías funcionales según los COGs fue más uniforme, predominando de forma general la producción y conversión energética, las proteínas de transporte y la traducción, estructura y biogénesis de ribosomas (Figura 16).



**Figura 15. Gráficos resumen de los resultados de proteómica cuantitativa agrupados en categorías funcionales principales.** Las comparaciones realizadas fueron entre la cepa silvestre en  $\downarrow$ Pi versus en  $\uparrow$ Pi, y las cepas mutantes PAO1 *ppk1* y PAO1 *ppk2* crecidas en  $\downarrow$ Pi versus la silvestre en  $\uparrow$ Pi en el primer caso y la silvestre en  $\downarrow$ Pi en los otros). Los resultados se muestran para proteínas con un aumento la expresión superior a 1,5 veces o una disminución inferior a -1,5 veces, en relación a la cepa control (cepa silvestre en  $\uparrow$ Pi en el primer caso y la silvestre en  $\downarrow$ Pi en los otros). Los datos de proteómica cuantitativa obtenidos mediante la técnica de ICPL de las distintas comparaciones, se agruparon en las categorías funcionales de metabolismo, procesos celulares y señalización, almacenaje y procesamiento de la información, y poco caracterizadas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/grace/fiew.cgi>).

Algunos cambios interesantes de los mutantes con respecto a la cepa silvestre, fueron el aumento en la expresión de las proteínas relacionadas con la biogénesis de la pared celular, membrana y envoltura (11% de los aumentos en el mutante *ppk1* y 5% en *ppk2*), y la motilidad y secreción (9% y 7% en las cepas mutantes *ppk1* y *ppk2* respectivamente). Por otro lado, además de las proteínas relacionadas con metabolismo, se observó una disminución en la expresión de proteínas relacionadas

con la adaptación a condiciones atípicas y el transporte de proteínas (aproximadamente 8% y 10% en ambos mutantes, respectivamente).



**Figura 16. Resultados de proteómica cuantitativa agrupados en subcategorías funcionales según los COGs.** Los resultados de las comparaciones en los proteomas totales analizados por ICPL para las cepas silvestre en  $\downarrow$ Pi versus en  $\uparrow$ Pi, y las cepas mutantes PAO1 *ppk1* y PAO1 *ppk2* crecidas en  $\downarrow$ Pi versus la silvestre en  $\downarrow$ Pi, fueron agrupadas según las bases de datos COG (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) y VFDB (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>). Los resultados se muestran para proteínas con un aumento la expresión superior a 1,5 veces o con una disminución inferior a -1,5 veces, en relación a la cepa control.



En relación a los factores de virulencia, en ambas cepas mutantes se observó un aumento en la expresión de proteínas relacionadas con su síntesis (Figura 16). En el mutante *ppk2*, la expresión de estas proteínas aumentó en un 20% en relación a la cepa silvestre, mientras que sólo una de ellas disminuyó su expresión. A diferencia esto, en el mutante *ppk1* el porcentaje de factores de virulencia que aumentó su expresión (10%) es similar al porcentaje que la disminuyó (8%).

Como ya se mencionó, la categoría funcional que presenta el mayor porcentaje de cambio en todas las cepas es el metabolismo energético. La limitación de fosfato durante el crecimiento de la cepa silvestre generó un incremento en la abundancia de proteínas relacionadas con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), como SucAB, FumC2 y SdhAB, y sus variantes que degradan aminoácidos para generar energía como la vía de degradación de metionina, representada por MetK y SahH, y la vía de degradación de arginina V (vía de la arginina deaminasa), de la cual se encontraron aumentados todos los componentes de la vía que culmina en la producción de amonio, CO<sub>2</sub> y ATP (ArcABC). Otras vías que generan sustratos para el ciclo TCA que se vieron incrementadas fueron las involucradas en la síntesis de acetil-CoA como AceEF, y la síntesis de succinato como GabD y GabT (Tabla suplementaria 1).

Adicionalmente, se observó una disminución en la expresión de proteínas relacionadas con la síntesis de aminoácidos aromáticos (PhhC), de valina (IlvC) y glutamina (GlnA). Además, se encontraron disminuidas algunas proteínas relacionadas con la respiración anaeróbica como PrpCD y FumC1, sin embargo esta última también puede participar en el ciclo TCA (Tabla suplementaria 2).

Con respecto a los cambios metabólicos experimentados por los mutantes *ppk1* y *ppk2* en carencia de fosfato, también se observaron alteraciones en la glicólisis y el ciclo TCA. En el mutante *ppk1* aumentó la abundancia de las proteínas Pgi y FumC1,



pero disminuyeron otras que también se asocian con la glicólisis, la fermentación y el ciclo TCA, como P<sub>gk</sub>, P<sub>ykA</sub>, A<sub>cnAB</sub> y P<sub>rpBC</sub>. En relación al metabolismo de aminoácidos, se observó un mayor número de proteínas que disminuyeron su expresión tanto en la biosíntesis de aminoácidos como en la degradación de ellos. Entre estas últimas se encuentran las relacionadas con la degradación de valina (M<sub>msA</sub>, I<sub>lvE</sub>), y de arginina (A<sub>rcABC</sub>), con excepción de la degradación de histidina que se vio incrementada producto del aumento de H<sub>utH</sub>. Algo similar se observó en el mutante *ppk2*, donde también se encuentran disminuidas las proteínas del metabolismo de aminoácidos P<sub>hhC</sub>, A<sub>rcC</sub> y A<sub>ruC</sub>, y del ciclo TCA y fermentación A<sub>cnAB</sub>, aunque se encuentran aumentadas las proteínas F<sub>umC1</sub>, N<sub>uoE</sub> y P<sub>rpD</sub> relacionadas con las mismas vías (Tablas suplementarias 3 y 4).

En ambos mutantes se encontró una disminución en la expresión de la proteína pirofosfatasa inorgánica, la cual estaba disminuida no significativamente en la cepa silvestre crecida en bajo fosfato ( $\log_2$  (promedio-mediana) = -0,525). En esta cepa además se encontró en reducida abundancia la proteína nucleósido difosfato quinasa (N<sub>dK</sub>), y lo mismo ocurrió para el mutante *ppk2*, sin embargo esta proteína no pudo ser identificada en el mutante *ppk1* (Tablas suplementarias 3 y 4).

En la condición de bajo P<sub>i</sub> en la cepa silvestre se observó un aumento en transportadores y porinas, varios de los cuales se asocian al transporte de fosfato, como P<sub>stB</sub> y P<sub>stC</sub>, y el regulador P<sub>hoU</sub>, lo que confirma el estado de escasez de fosfato en la célula. En los mutantes crecidos en bajo P<sub>i</sub> no se observó una mayor expresión de las proteínas asociadas con la adquisición de fosfato, en relación a la cepa silvestre (Tabla 4).

Por otro lado, en la cepa silvestre en bajo P<sub>i</sub> se encontró aumentada la expresión de una chaperona y cinco proteasas, una de las cuales es la proteasa Lon que

participa en la degradación de proteínas ribosomales para generar aminoácidos durante la escasez de nutrientes (123) (Tabla suplementaria 1).

**Tabla 4. Listado de proteínas relacionadas con el metabolismo del fosfato que cambiaron significativamente los niveles de expresión en los análisis proteómica cuantitativa.**

Comparación	Proteína	Gen	Locus Tag	Log <sub>2</sub> (mutante / silvestre)-mediana
<b>PAO1↓Pi vs. PAO1↑Pi</b>	-Proteína de importación de fosfato y unión a ATP PstB	<i>pstB</i>	PA5366	2,45
	- Componente de transmembrana del complejo de transporte específico de fosfato	<i>pstC</i>	PA5368	2,36
<b>ppk1↓Pi vs. PAO1 Pi↓</b>	-Proteína reguladora del sistema de transporte de fosfato PhoU	<i>phoU</i>	PA5365	1,98
	-Componente de transmembrana del complejo de transporte específico de fosfato	<i>pstC</i>	PA5368	-0,70
<b>ppk2↓Pi vs. PAO1 Pi↓</b>	-Probable regulador de respuesta de dos componentes (PhoB)	<i>phoB</i>	PA3346	0,75
	-Proteína reguladora del sistema de transporte de fosfato PhoU	<i>phoU</i>	PA5365	-0,74

En carencia de fosfato, al comparar ambos mutantes con la cepa silvestre se observó un marcado aumento en la expresión de transportadores y porinas. En el mutante *ppk1* se vio aumentada una bomba de eflujo tipo Mex y el receptor PhuR, y en ambas cepas mutantes aumentaron las porinas OprD y OprE. Todas estas proteínas se vieron disminuidas en la cepa silvestre crecida en bajo fosfato en comparación con la misma en alto fosfato. Sólo la porina OprO y la proteína MexA, otro tipo de bomba de eflujo de drogas, se encontraron aumentadas en esta cepa en bajo Pi (Tabla 5).

El regulador transcripcional MvaT se encontró aumentado en la cepa silvestre crecida en bajo Pi, no obstante, en los mutantes se observó un aumento en la expresión de este regulador mayor aun al observado en la cepa silvestre (Tablas

suplementarias 1 y 3). Se ha descrito que MvaT modifica la expresión del operón MexEF-OprN (relacionado con la expulsión de diversas drogas) de forma antagónica a la expresión de la porina OprD, de manera que una disminución en los niveles de MvaT aumenta la expresión de MeEF-OprN y disminuye la de OprD (131). En ambos mutantes se observó esta correlación, donde MvaT se encontró aumentada al igual que OprD, pero las proteínas relacionadas con la bomba MexEF-OprN se vieron disminuidas.

**Tabla 5. Listado de proteínas de transporte que cambiaron significativamente los niveles de expresión en los análisis de proteómica cuantitativa.**

Comparación	Proteína	Gen	Locus Tag	Log <sub>2</sub> (mutante / silvestre)-mediana	
PAO1↓Pi vs. PAO1↑Pi	-Porina O	<i>oprO</i>	PA3280	3,01	
	-Proteína de resistencia a multidrogas MexA	<i>mexA</i>	PA0425	0,873	
	-Porina D	<i>oprD</i>	PA0958	-0,737	
	-Porina de membrana externa inducible anaeróticamente OprE	<i>oprE</i>	PA0291	-0,763	
	-Probable receptor dependiente de TonB		PA3268	-0,897	
	-Metaloproteínasa de membrana externa de rompimiento de insulina	<i>icmP</i>	PA4370	-0,926	
	-Probable proteína de membrana externa		PA2760	-1,18	
	-Probable proteína no caracterizada		PA2349	-1,28	
	-Transportador ABC		PA4223	-1,62	
	-Porina de dipéptido glicina-glutamato OpdP	<i>opdP</i>	PA4501	-1,66	
	-Receptor de heme/hemoglobina de membrana externa PhuR	<i>phuR</i>	PA4710	-1,71	
	ppk1↓Pi vs. PAO1 Pi↓	-Transportador ABC		PA4223	2,43
		-Receptor de heme/hemoglobina de membrana externa PhuR	<i>phuR</i>	PA4710	2,27
-Proteína de unión a ATP e importación de sulfato/tiosulfato CysA		<i>cysA</i>	PA0280	1,60	



	-Porina D	<i>oprD</i>	PA0958	1,58
	-Porina de membrana externa inducible anaeróbicamente OprE	<i>oprE</i>	PA0291	1,45
	-Transportador de eflujo de multidrogas RND MexF	<i>mexF</i>	PA2494	1,32
	-Probable proteína de membrana externa		PA2760	0,84
	-Probable receptor dependiente de TonB		PA3268	0,78
	-Porina O	<i>oprO</i>	PA3280	-1,23
	-Probable componente de unión a ATP de transportador ABC		PA4595	-1,33
	-Proteína de membrana externa H1	<i>oprH</i>	PA1178	-1,48
	-Proteína de membrana externa de eflujo de multidrogas OprN	<i>oprN</i>	PA2495	-3,99
	-Transportador ABC		PA4223	2,07
	-Porina D	<i>oprD</i>	PA0958	1,30
	-Probable componente de unión a ATP de transportador ABC (transporte de ectoína)			
	-Permeasa de unión a ATP y exportación de lípido A MsbA	<i>msbA</i>	PA5152	1,21
	-Proteína G de biosíntesis de glucanos		PA4997	0,82
<b><i>ppk2</i> ↓ Pi vs.</b>	-Proteína de membrana externa	<i>oprM</i>	PA5078	0,67
<b>PAO1 Pi ↓</b>	-Porina O	<i>oprO</i>	PA0427	-0,66
	-Transportador de eflujo de multidrogas RND MexF	<i>mexF</i>	PA3280	-0,68
	-Transportador de eflujo de multidrogas de fusión de membrana RND MexE	<i>mexE</i>	PA2494	-0,74
	-Proteína de membrana externa H1	<i>oprH</i>	PA2493	-1,32
	-Proteína de membrana externa de eflujo de multidrogas OprN	<i>oprN</i>	PA1178	-1,36
			PA2495	-2,58

Dentro de los factores de virulencia que mostraron cambios en la cepa silvestre en bajo Pi, se encontraron aumentadas dos proteínas relacionadas con el sistema de secreción tipo 6 (T6SS) y otras asociadas a la producción del exopolisacárido alginato, además de una proteína que participa en la síntesis de lipopolisacárido (Tabla 6). Por otro lado, las proteínas relacionadas con la síntesis de pigmentos tóxicos mostraron una menor expresión en bajo Pi en esta cepa, mientras que en los mutantes *ppk1* y



*ppk2* se observó un aumento de la expresión de proteínas relacionadas con la síntesis del sideróforo pioquelina y de receptores de ferrisideróforos. No obstante, sólo en el mutante *ppk2* se observó un aumento en la expresión del sideróforo pioverdina (Tabla 6). En ambos mutantes se incrementaron además proteínas relacionadas con el fenotipo mucoide, como MucD y el factor sigma de función extracitoplasmática AlgU, que regula la síntesis de alginato (35). En el mutante *ppk2* se observó una mayor cantidad de proteínas asociadas a la producción de factores de virulencia que aumentaron su expresión, a las que pueden sumarse las relacionadas con el sistema de secreción tipo 6 (PA2366 y PA2365). Por otro lado, en el mutante *ppk1* se observaron dos proteínas relacionadas con la síntesis de pioverdina con una expresión muy disminuida con respecto a la cepa silvestre, lo que es considerable tomando en cuenta que la síntesis de este sideróforo ya se encontraba disminuida en esta cepa en bajo Pi (Tabla 6).

**Tabla 6. Listado de las proteínas relacionadas con la producción y regulación de factores de virulencia, que cambiaron los niveles de expresión en los análisis de proteómica cuantitativa.**

Comparación	Proteína	Gen	Locus Tag	Log <sub>2</sub> (mutante / silvestre)-mediana
PAO1↓Pi vs. PAO1↑Pi	-Proteína reguladora de la transcripción AlgP	<i>algP</i>	PA5253	1,738
	-Fosfomanomutasa/fosfoglucomutasa	<i>algC</i>	PA5322	1,729
	-Probable isla de secreción Hcp (HSL-I), sistema de secreción tipo VI	<i>taqQ1</i>	PA0070	1,518
	-Proteína Hcp1 componente del sistema de secreción tipo VI (citotoxina secretada)	<i>hcp1</i>	PA0085	1,037
	-Probable metiltransferasa específica a fenazinas	<i>phzM</i>	PA4209	-0,616
	-Receptor de ferripioverdina	<i>fpvA</i>	PA2398	-0,926
	-Probable componente de unión a ATP de transportador ABC		PA4222	-1,616









	-Receptor de Fe(3+)-pioquelina	<i>fptA</i>	PA4221	-1,712
	-Proteína de biosíntesis de pioquelina PchD	<i>pchD</i>	PA4228	-2,178
	-Segundo receptor de pioverdina férrica FpvB	<i>fpvB</i>	PA4168	-2,248
<b><i>ppk1</i> ↓ Pi vs. PAO1 Pi ↓</b>	-Receptor de Fe(3+)-pioquelina	<i>fptA</i>	PA4221	2,956
	-Probable componente de unión a ATP de transportador ABC		PA4222	2,095
	-Sintetasa de ácido dihidroaeruginoso	<i>pchE</i>	PA4226	1,665
	-Receptor de ferrisideróforos de tipo hidroxamato		PA4514	1,170
	-MucD	<i>mucD</i>	PA0766	1,091
	-Fosfomanomutasa/fosfoglucomutasa	<i>algC</i>	PA5322	-0,691
	-Proteína hcp1	<i>hcp1</i>	PA0085	-1,156
	-Sintasa de pioverdina PvdF	<i>pvdF</i>	PA2396	-2,553
	-Probable dipeptidasa (síntesis de pioverdina)		PA2393	-5,138
	<b><i>ppk2</i> ↓ Pi vs. PAO1 Pi ↓</b>	-Sintetasa de ácido dihidroaeruginoso	<i>pchE</i>	PA4226
-Receptor de Fe(3+)-pioquelina		<i>fptA</i>	PA4221	1,913
-Pioquelina sintetasa		<i>pchF</i>	PA4225	1,678
-Probable componente de unión a ATP de transportador ABC			PA4222	1,678
-Proteína G de la vía general de secreción (T2SS)		<i>xcpT</i>	PA3101	1,415
-Transportador de sideróforos AmpP (familia RhtX/FptX)		<i>ampP</i>	PA4218	0,968
-Factor sigma-H de ARN polimerasa		<i>algU</i>	PA0762	0,718
-MucD		<i>mucD</i>	PA0766	0,708
-PvdL		<i>pvdL</i>	PA2424	0,648
-Proteína hcp1		<i>hcp1</i>	PA0085	-1,282

Aunque la pared celular y sus componentes se muestran en una categoría separada, estos también corresponden a factores de virulencia y se observaron cambios en su expresión en los mutantes. En ambos se encontró reducida la abundancia de proteínas relacionadas con la síntesis de pared celular y LPS, como PagL, Wbpe y Wzz. En el mutante *ppk2* además se encontró en menor cantidad la proteína de unión a galactosa LecB, lectina que participa en la adhesión celular (21) (Tabla suplementaria 4).

Contrario a estas disminuciones en factores de virulencia observados en ambos mutantes, se encontraron varias proteínas asociadas a un aumento en la motilidad celular, como las de biogénesis del pili (PilC y PilQ, Tabla suplementaria 3)

Por otro lado, se observó además en estos mutantes una disminución en las proteínas relacionadas con el estrés oxidativo, como KatA, AhpC y una probable peroxidasa en el mutante *ppk1* y estas mismas más la superóxido dismutasa SodB en el mutante *ppk2* (Tabla suplementaria 4).

#### **3.4. Efecto de las mutaciones en la virulencia bacteriana**

En *P. aeruginosa*, los poliP están directamente relacionados con procesos fisiológicos que se asocian con la capacidad infectiva, incluyendo la motilidad, la comunicación de tipo QS y la producción de factores de virulencia (103, 104). Además, se ha establecido que mutaciones en la enzima PPK1 generan una atenuación en la virulencia de distintos microorganismos, como por ejemplo se ha observado en *P. aeruginosa* con el modelo de infección ocular en ratón y de ratón quemado (91, 105), y también en otros patógenos como *Salmonella* sp. y *Shigella* sp. donde mutaciones en el gen *ppk1* disminuyen la capacidad de invadir células epiteliales (56). Debido a la importancia de estos procesos en el establecimiento de la enfermedad, se decidió estudiar la virulencia de cepas *P. aeruginosa* mutantes de la síntesis de poliP en un modelo animal de infección. Para ello decidimos utilizar el pez modelo *Danio rerio* en un etapa del desarrollo larval donde sólo está presente el sistema inmune innato, ya que se ha descrito que en estas condiciones el pez cebra puede ser utilizado como modelo de patogénesis bacteriana con *P. aeruginosa* PAO1 y PA14, causando la muerte de los embriones de pez al infectarlos por microinyección (16, 96).

### 3.4.1. Desarrollo de un método de infección no invasivo en el modelo animal pez cebra (*Danio rerio*)

Debido a la naturaleza oportunista de la infección generada por *P. aeruginosa*, los ensayos descritos en el pez cebra se caracterizan por la inyección de una alta carga bacteriana directamente en el sistema circulatorio del pez, procedimiento altamente invasivo que genera un porcentaje alto de muerte sólo por efecto de la inyección (16). Además de la letalidad generada por el método, el proceso de inyección es dificultoso lo que impide su uso en ensayos masivos (78). Por otro lado, el ingreso directo de bacterias al torrente sanguíneo no forma parte del ciclo normal de infección de *P. aeruginosa* en la mayoría de los casos, y podría enmascarar otros procesos fisiológicos tanto de la bacteria como de la respuesta inmune del pez. Por estas razones, se decidió desarrollar un método no invasivo donde se sumergen larvas de 72 horas post fecundación (hpf) en suspensiones bacterianas de alta densidad (Tabla 7), luego de haber estresado a las larvas poniéndolas a 16-20°C por unas horas antes de la incubación con bacterias y durante todo el ensayo.

**Tabla 7. Conteo de células viables de las suspensiones bacterianas utilizadas en el ensayo de sobrevivencia con el pez cebra.** Se realizó para un total de 5 experimentos distintos con su respectiva desviación estándar, a partir de suspensiones bacterianas con  $DO_{600}=0,7$ .

Cepa	Suspensión bacteriana en placas con pez cebra (UFC/mL x10 <sup>8</sup> )
PAO1 ↑Pi	5 ± 1,26
PAO1 <i>ppk1</i> ↑Pi	5,8 ± 1,06
PAO1 <i>ppk2</i> ↑Pi	4,5 ± 1,46
<i>E. coli</i> DH5α ↑Pi	5,2 ± 1,22
PAO1 ↓Pi	4,6 ± 1,34
PAO1 <i>ppk1</i> ↓Pi	4,6 ± 0,546
PAO1 <i>ppk2</i> ↓Pi	4,3 ± 1,7
<i>E. coli</i> DH5α ↓Pi	4,6 ± 1,3



Para descartar que el daño observado en el pez se debiera a la alta concentración de bacterias en el medio (que genere por ejemplo una disminución en el oxígeno disponible), se utilizó como control una cepa bacteriana no patógena de *E. coli* (DH5 $\alpha$ ). Las larvas se observaron cada hora, se contabilizó la mortalidad y se evaluó el estado fisiológico de ellas.

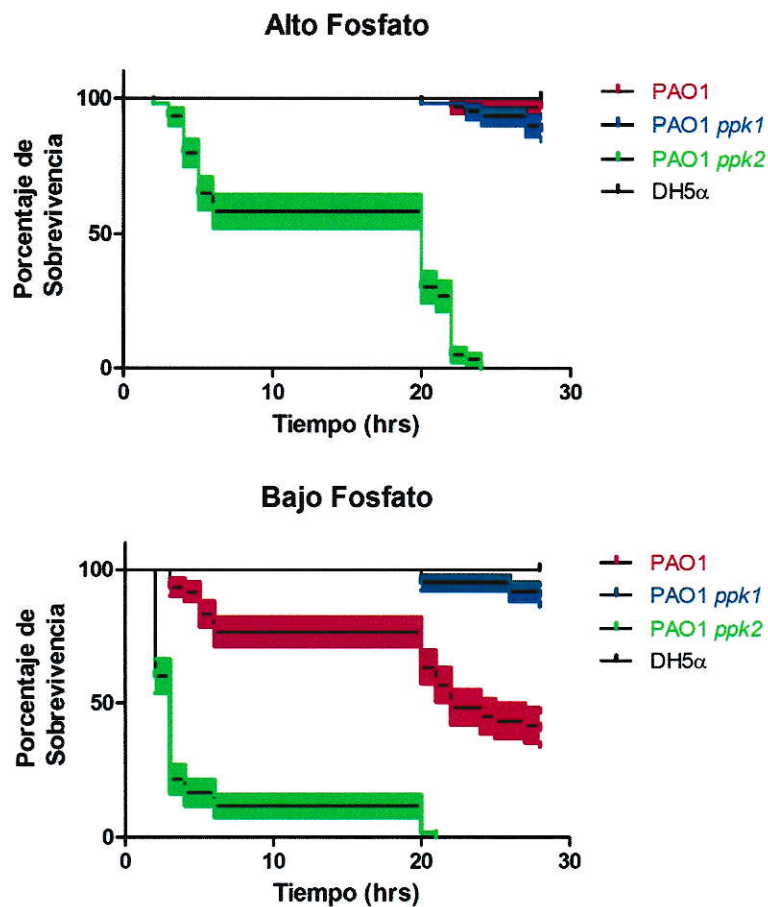
#### **3.4.2. Curvas de sobrevivencia**

Luego de contabilizar el número de peces muertos en cada hora, se realizaron las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para las cepas mutantes *ppk1* y *ppk2* y silvestre de *P. aeruginosa* PAO1, crecidas en los medios NGM  $\uparrow$ Pi y NGM  $\downarrow$ Pi (Figura 17). Los ensayos se monitorearon por 2 días hasta las 28 horas post infección (hpi). Se realizaron dos análisis estadísticos para las curvas de sobrevivencia, el de Mantel-Cox que presupone que el número de muertes por unidad de tiempo es la misma para todos los tiempos (razón de riesgo), y el de Gehan-Breslow-Wilcoxon que no asume una función de riesgo pero le otorga mayor valor a las muertes que ocurren en tiempos iniciales.

Como se realizaron varias curvas para cada condición, se debe hacer una corrección para comparaciones múltiples de forma que los valores de P significativos son aquellos menores a 0,0083 (corresponde a 0,05 dividido en el número de comparaciones realizadas).

En las curvas se observa que la letalidad de la cepa silvestre aumentó al crecerla en el medio con bajo fosfato, lo que se reflejó en una disminución de la sobrevivencia de los peces ( $P < 0,0001$  según el test de Mantel-Cox y de Gehan-Breslow-Wilcoxon). Cabe señalar que no se observó muerte en los peces incubados en *E. coli* DH5 $\alpha$  en todas las condiciones probadas.





**Figura 17. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para larvas de pez cebra infectadas con bacterias crecidas en medio NGM con alto o bajo fosfato.** Las cepas mutantes y silvestre de *P. aeruginosa* PAO1 fueron crecidas en medio NGM con y sin fosfato por 18 hrs a 37°C con agitación. Las larvas de 72 horas post fertilización (hpf) se incubaron en una suspensión bacteriana de  $\sim 5 \times 10^8$  UFC/mL en medio embrionario E3 estéril, a 20°C. Se muestran 5 experimentos independientes con 10 larvas cada uno, y el ancho de las curvas indica el error estándar. Para el análisis estadístico se hicieron los test de Mantel-Cox (Log-rank test) y de Gehan-Breslow-Wilcoxon, utilizando la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples (valores significativos con  $P < 0,0083$ ).

El aumento en la letalidad de las bacterias crecidas en bajo Pi se vio también el mutante *ppk2* ( $P < 0,0001$  para ambos test), pero no en el *ppk1* ( $P = 0,7836$  para el test de Mantel-Cox y  $P = 0,8079$  para el de Gehan-Breslow-Wilcoxon), el que presentó una letalidad cercana al 10% en ambas condiciones de disponibilidad de fosfato, que no es estadísticamente distinta de la de *E. coli* (Figura 17).

Por otro lado, en el medio con alto fosfato se observó que el mutante *ppk1* se comporta de forma similar que la cepa silvestre presentando una baja letalidad, ya que el mutante generó un 11% de mortalidad en los peces y el silvestre un 4% (Figura 17). Además, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de estas dos cepas ( $P=0,905$  según el test de Mantel-Cox y  $P=0,0968$  según el de Gehan-Breslow-Wilcoxon), ni tampoco al comparar ambas curvas con las de *E. coli* ( $P=0,1948$  en ambos test para la cepa silvestre, y  $P=0,0132$  para el mutante *ppk1*).

Para el caso del mutante *ppk2*, las curvas de sobrevivencia presentaron diferencias significativas tanto con *E. coli* ( $P<0,0001$  en ambos test) como con *P. aeruginosa* silvestre ( $P<0,0001$  en ambos test), alcanzando un 100% de letalidad a las 24 hpi (Figura 17). Esto se repitió en la condición de carencia de fosfato, donde la letalidad del mutante *ppk2* fue mayor que la de la cepa silvestre, ya que al finalizar el ensayo los peces incubados con ella presentaron un 40% de sobrevivencia, mientras que el mutante *ppk2* generó un 100% de letalidad a las 21 hpi (Figura 17).

#### **3.4.3. Efectos de la toxicidad bacteriana en el pez cebrá**

En base a los resultados observados, se construyó una escala de infección tomando en cuenta los cambios fisiológicos visibles producto de la incubación con bacterias, correspondientes al latido y la frecuencia cardíaca, el flujo sanguíneo y el reflejo de respuesta al tacto.

La escala describe el estado infectivo en que se encuentra el pez, donde 3 corresponde a una larva normal y 0 a la muerte (Tabla 8). Las larvas en estado 2 podían en ocasiones recuperarse, pero una vez que llegaban al estado 1 morían dentro de las siguientes horas. Inesperadamente, se observó que los peces más afectados y próximos a la muerte (estado 1 y 0) sufrían una torción aparentemente muscular en la

cola o en las aletas pectorales, o en ambas, en uno o más planos, que le impedía moverse con normalidad. Esto se observó en los peces prontos a morir producto de la incubación con cualquiera de las cepas de *P. aeruginosa*, pero sólo se retrató para la cepa silvestre (Figura 18B).

**Tabla 8. Escala de infección desarrollada a partir de parámetros fisiológicos observables durante la infección del pez cebra por *P. aeruginosa* PAO1.**

Estado de Infección	Características
3	Larvas con flujo sanguíneo y latido cardíaco normales, reactivas al tacto.
2	Respuesta al tacto mínima (nadan luego de tocar la cola 2 ó 3 veces), disminución del flujo sanguíneo en la cola.
1	Disminución de la frecuencia cardíaca y flujo sanguíneo, acumulación de sangre en el corazón, inmovilidad (no nadan luego del tercer tacto).
0	Larvas muertas (sin flujo sanguíneo ni latido cardíaco observable), colas y/o aletas torcidas.

Luego de establecer el nivel de infección de las larvas, se tomaron 3 puntos de las curvas de letalidad donde se observó mayor diferencia entre las cepas, y se graficó el estado de infección de los peces para esos puntos que corresponden a 1, 6 y 24 hpi (Figura 19).

De forma general, se observó que las cepas de *P. aeruginosa* crecidas en alto fosfato produjeron menos daño a los peces que en bajo fosfato (Figura 19), lo que indica que las bacterias en esta condición no sólo son menos letales que las mismas en bajo Pi, sino también menos virulentas. Por ejemplo, el mutante *ppk2* generó daño tempranamente en las larvas infectadas sólo en la condición de bajo Pi, observándose cerca de un 60% de larvas afectadas entre el estado 2 y el estado 1 (Figura 19A). Este

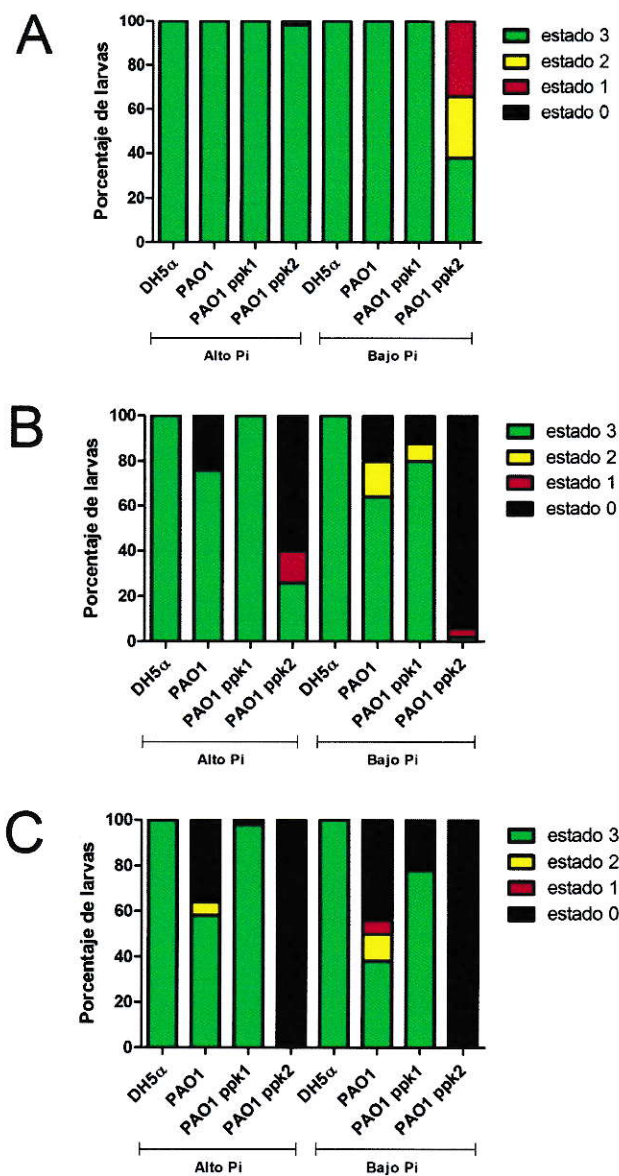


mutante, que demostró ser el más letal en las curvas de sobrevivencia (Figura 17), fue también el que generó más daño en las larvas, ya que en éste se observó un mayor porcentaje de larvas en estado 1 que en las otras cepas.



**Figura 18. Efectos de la infección por *P. aeruginosa* PAO1 en el pez cebra.** (A) Vista dorsal (izquierda) y lateral (derecha) de una larva control de 72 hpf en medio E3 sin bacterias. (B) Cuatro ejemplos representativos de larvas de 72 hpf incubadas por media hora en una solución bacteriana en medio E3 de  $\sim 1 \times 10^9$  UFC/mL. Las fotos se tomaron en campo claro con 1,6X de aumento y antes de que las larvas murieran, excepto en la foto de abajo a la derecha donde se muestra una larva muerta con necrosis ocular.





**Figura 19. Estados de infección del pez cebra producto de la incubación con las distintas cepas de *P. aeruginosa* PAO1.** Las larvas fueron inspeccionadas visualmente luego de 1 hora de incubación con bacterias (A), 6 horas (B) y 10 horas (C). Estas se clasificaron según los distintos estados de infección, lo cuales se definieron anteriormente (Tabla 9).

Se observó a las 24 hpi (Figura 19C) un mayor porcentaje de larvas muertas (estado 0) que afectadas (estados 1 y 2) en relación a los otros tiempos de incubación

(Figura 19 A y B), y en este tiempo el porcentaje de larvas muertas se corresponde con las que se vieron afectadas en los tiempos anteriores. Esto indica que los eventos de muerte son precedidos de los estados 2 y 1 de infección, de forma que el daño observado en las larvas es un indicativo de una futura muerte.

Por otro lado, con esta aproximación se diferenció claramente el efecto de la incubación con *P. aeruginosa* silvestre y mutante *ppk1*, de la incubación con *E. coli*, ya que aunque estas cepas no mostraron diferencias significativas en la mortalidad de los peces, sí se observaron cambios en el daño generado, esto debido a que las larvas incubadas con *E. coli* siempre estuvieron en estado 3, mientras que se encontraron larvas en los distintos estados a lo largo de la incubación con cepas de *P. aeruginosa* (Figura 19).

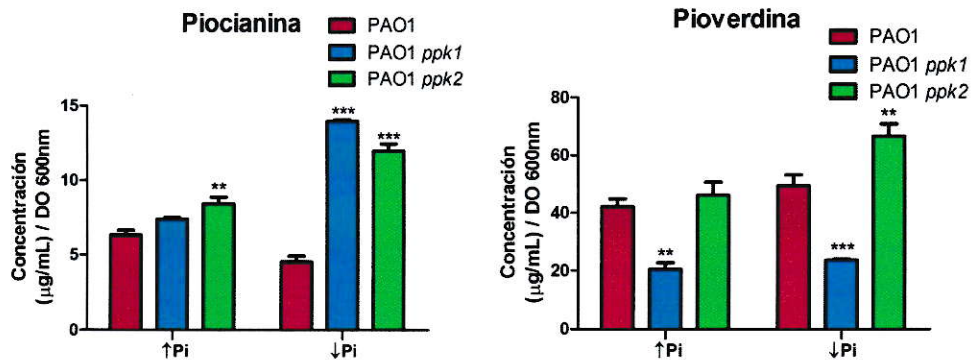
#### **3.4.4. Producción de pigmentos tóxicos en cultivos bacterianos utilizados para los ensayos de infección en pez cebra**

Para evaluar la producción de los factores de virulencia pioverdina y piocianina en las mismas bacterias que posteriormente se utilizarían para la incubación con los peces, se utilizó el mismo método espectrofotométrico que se usó para cultivos suplementados con glicerol (Figuras 8).

En la cepa silvestre, la producción de piocianina fue menor en bajo fosfato ( $P < 0,01$ ), mientras que no hubo diferencias significativas en la producción de pioverdina en los dos medios (Figura 20).

Por otro lado, en ambos mutantes se observó una mayor producción de piocianina en bajo fosfato ( $P < 0,001$ ), y en alto fosfato sólo el mutante *ppk2* obtuvo una mayor producción de este compuesto ( $P < 0,01$ ).

Con respecto a la pioverdina, el mutante *ppk2* fue la única cepa que aumentó significativamente la producción en el medio con bajo fósforo ( $P < 0,01$ ). En relación a la cepa silvestre, el mutante *ppk1* tuvo una menor producción de este sideróforo en los dos medios ( $P < 0,01$  en alto Pi y  $P < 0,001$  en bajo Pi), mientras que el mutante *ppk2* mostró un aumento significativo de la producción en el medio con bajo Pi ( $P < 0,01$ ) (Figura 20).



**Figura 20. Medición espectrofotométrica de pioverdina y piocianina en sobrenadantes de cultivos de bacterias utilizados para la incubación con pez cebra.** Los cultivos de bacterias de *P. aeruginosa* PAO1 silvestre y mutantes (*ppk1* y *ppk2*) se crecieron por 18 horas en medio NGM↑Pi y NGM↓Pi. Se colectó el sobrenadante de cada cultivo y se midió la absorbancia a las longitudes de onda asociadas a cada compuesto (piocianina 313 nm, pioverdina ↑Pi 386 nm y pioverdina ↓Pi 383 nm), y se estandarizó por la  $DO_{600}$ . Las bacterias se utilizaron para la incubación con las larvas de pez cebra. Se muestra el promedio  $\pm$  error estándar de tres mediciones independientes. Se realizó un ANOVA de dos vías y un post-test de Bonferroni, y las diferencias estadísticamente significativas entre las cepas mutantes y la silvestre se muestran en el gráfico (asteriscos).

## 4. DISCUSIÓN

La ausencia de los polifosfatos tiene efectos pleiotrópicos en las bacterias. En particular en *P. aeruginosa*, se ha demostrado que participan en numerosos procesos incluyendo la motilidad (103), la formación de biopelículas, la comunicación del tipo “quorum sensing” y la virulencia en diferentes modelos animales (105). La asociación entre los polifosfatos y la virulencia se ha adquirido relevancia clínica a nivel global, ya que cada vez existe más evidencia de la aparición de cepas patógenas resistentes a múltiples drogas (MDR) por el uso desmesurado de antibióticos (5), por lo que se ha propuesto a los poliP como un nuevo posible blanco para drogas antimicrobianas.

El potencial del metabolismo de los polifosfatos como nuevo blanco terapéutico se debe a varios factores. Además de los efectos ya mencionados en la virulencia de *P. aeruginosa*, mutaciones en las enzimas de síntesis de poliP en otros patógenos como *Salmonella* sp. y *Shigella flexneri*, disminuyen la resistencia celular a la acidez y a polimixina B, y la capacidad de estos mutantes para invadir epitelios (102). Sin embargo, como los efectos de las mutaciones en el metabolismo de los polifosfatos son variados, el uso de técnicas Ómicas permite un estudio más comprensivo del comportamiento de estos mutantes, y en este caso, los ensayos utilizados se complementan ya que se realizaron a un nivel molecular (proteómico) y a uno celular (fenotípico).

### 4.1. Análisis de los Microarreglos Fenotípicos

Los cambios más notables observados en el crecimiento de las cepas mutantes en relación a la cepa silvestre en los distintos sustratos utilizados, corresponden principalmente a las placas de sensibilidad a compuestos químicos (PM11-20).



Con respecto a las placas metabólicas (PM1-10), en el mutante *ppk1* se observaron 9 ganancias y 5 pérdidas fenotípicas, correspondientes al 23% de los cambios observados. En el mutante *ppk2*, el 29% de los cambios fenotípicos corresponden a estas placas, de los cuales 6 fueron ganancias y 5 fueron pérdidas. De esta forma, los mutantes del metabolismo de síntesis de los poliP mostraron una capacidad de utilizar nutrientes similar a la de la cepa silvestre. A diferencia de lo observado en estos mutantes, la mayoría de los cambios en los microarreglos fenotípicos del mutante  $\Delta ppk1$  de *E. coli* correspondieron a diferencias en la utilización de fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo y azufre (datos de nuestro laboratorio no publicados). Esto puede deberse a que en *P. aeruginosa* existe más de una copia del gen que codifica para polifosfato quinasa, mientras que en *E. coli* sólo existe uno y por tanto el fenotipo del mutante es más severo.

Previamente, en las placas de sensibilidad a compuestos químicos (PM11-20) se encontraron 14 pérdidas fenotípicas en el mutante  $\Delta ppk1$  de *E. coli*, que representan el 87,5% de todas las pérdidas observadas. Esto se condice con lo observado en ambos mutantes de *P. aeruginosa*, ya que la mayoría de las pérdidas fenotípicas se observaron en las placas de sensibilidad (77% de los cambios en el mutante *ppk1* y 71% en el mutante *ppk2*). Cabe destacar que los mutantes de ambas especies bacterianas mostraron una mayor sensibilidad a múltiples antibióticos con distintos blancos de acción. Los mutantes de *P. aeruginosa* fueron sensibles a antibióticos tan diversos como cloranfenicol, tianfenicol y el aminoglicósido estreptomina, los que inhiben la síntesis de proteínas, algunos  $\beta$ -lactámicos como oxacilina y nafcilina, y sulfonamidas que inhiben la síntesis de folato como sulfadiazina y sulfatiazol. La sensibilidad observada en los mutantes puede explicarse, al menos en parte, gracias a los resultados obtenidos de los ensayos de proteómica cuantitativa.

En *P. aeruginosa* existe una familia de bombas de eflujo de múltiples drogas llamada RND (“Resistance-Nodulation-Cell Division”), o bombas tipo Mex (2, 65, 107). A la fecha se han descrito en *P. aeruginosa* 11 tipos de bombas de eflujo capaces de expulsar distintos antibióticos de la célula, y uno de ellos se encontró disminuido en ambos mutantes en comparación con la cepa silvestre en bajo Pi, la bomba MexEF-OprN, la cual confiere resistencia a cloranfenicol, trimetoprim y quinolonas, y susceptibilidad a algunos  $\beta$ -lactámicos y amiglicósidos (60, 61). La regulación de la expresión de los distintos tipos de bombas no está completamente dilucidada, sin embargo el operón *mexEF-oprN* tiene una baja expresión basal en cepas silvestre (60), y es el único que se conoce cuya expresión es regulada positivamente por un gen ubicado río arriba de este operón, llamado *mexT* (59). La sobreexpresión de este operón se induce en presencia de antibióticos, y es mediada por las proteínas MexT y/o MexS, pero también se genera por estrés metabólico mediado por un mecanismo independiente de MexT (65).

La proteína MexT no fue identificada en los ensayos de proteómica cuantitativa en ninguna de las condiciones estudiadas, por lo que no pueden relacionarse directamente los niveles de expresión de la bomba MexEF-OprN con este regulador. Sin embargo, se ha descrito que MvaT también regula la expresión de esta bomba de forma específica, pero independientemente de la acción de MexT (131). MvaT es un regulador transcripcional que pertenece a la familia de proteínas H-NS similares a las histonas de estructuración del nucleóide (15), y es además un regulador global de la expresión de genes de virulencia, ya que se ha descrito que la inactivación del gen *mvaT* en *P. aeruginosa* genera un aumento en la producción de pirocianina, de lectina PA-IL y de las moléculas autoinducidas C4-HSL y oxo-C12-HSL, y también una disminución en el nado tipo “swarming” y la producción de elastasa y proteasa LasA

(27). La modificación de la expresión de la bomba MexEF-OprN por parte de MvaT se caracteriza por un concomitante aumento de la expresión de la proteína de membrana externa OprD (131), porina permeable a imipenem, lo que genera un aumento en la sensibilidad a este antibiótico en *P. aeruginosa* (86). Interesantemente, en carencia de fosfato tanto en la cepa silvestre como en los mutantes *ppk1* y *ppk2*, los ensayos de proteómica cuantitativa revelaron un aumento en la expresión del regulador MvaT (Tablas suplementarias 1 y 3). No obstante, sólo en las cepas mutantes se observó una disminución de las proteínas que conforman la bomba de eflujo MexEF-OprN (Tabla 5). Por otro lado, en ambos mutantes los aumentos en i) la expresión de la porina OprD (Tabla 5), ii) la sensibilidad a cloranfenicol y tianfenicol, y iii) la resistencia a carbenicilina, sugieren que la disminución en la expresión de la bomba podría deberse a la acción del regulador MvaT.

En relación a los otros antibióticos frente a los cuales las bombas MexEF-OprN confieren resistencia, sólo fue testeado en los microarreglos fenotípicos el trimetoprim, con el cual no se observaron diferencias significativas entre los mutantes y la cepa silvestre. Una posible explicación para esto es que las concentraciones de antibióticos fijadas para los experimentos de microarreglos fenotípicos por Biolog®, son más bajas que las utilizadas para *P. aeruginosa*, ya que estos ensayos fueron desarrollados para *E. coli*. Esto también pudo haber dado como resultado falsos negativos para otros antibióticos, frente a los cuales los mutantes *ppk1* y *ppk2* podrían ser más sensibles que la cepa silvestre.

Por otro lado, se identificaron otros 10 antibióticos y 19 compuestos tóxicos (quelantes, detergentes, ionóforos, iones tóxicos y agentes oxidantes), que no pueden relacionarse directamente con la acción de la bomba MexEF-OprN, y a los que las cepas mutantes son menos resistentes que la cepa silvestre. En estos mutantes se



encontró aumentada la expresión de distintas proteínas de membrana como porinas y transportadores de tipo ABC (Tabla 5). Lo anterior, en conjunto con la disminución de algunas proteínas de biosíntesis de membrana y pared celular (Tabla suplementaria 4), podría indicar que las mutaciones en la síntesis de los poliP generan alteraciones en la permeabilidad celular a distintos agentes tóxicos.

#### **4.2. Cambios en la virulencia de las cepas mutantes *ppk1* y *ppk2***

La regulación génica dependiente de la densidad celular se basa en la liberación de moléculas soluble que son sensadas por otras bacterias. En *P. aeruginosa* existen al menos dos sistemas autoinductores (LasRI y RhlRI) que se interconectan de forma jerárquica, donde LasR/3-oxo-C12-HSL activa al sistema RhlR/C4-HSL (69), y en conjunto gatillan la transcripción de los genes dependientes del “quorum sensing” (QS), muchos de los cuales están involucrados en la virulencia bacteriana (38, 92, 114, 132). Es por esto que se ha buscado utilizar este sistema autoinductor como un blanco para drogas antimicrobianas (115, 118), y por tanto es un sistema a considerar cuando se busca la atenuación de la virulencia en cepas patógenas.

Estudios anteriores demuestran que la expresión de RhlR depende de LasR en medios nutritivos, mientras que bajo condiciones de carencia de fosfato varios activadores transcripcionales (como Vfr, RhlR y  $\sigma^{54}$ ) participan en la expresión de *rhlR* desde múltiples promotores, fomentando un aumento en su expresión (69). Además, se ha descrito que bajas concentraciones de fosfato en el medio reducen los niveles de AHLs (7). Por otro lado, mutaciones en el gen *ppk1* en *P. aeruginosa* (y en otras bacterias patógenas) generan una disminución en la producción de AHLs y en la virulencia (55, 57, 104, 105, 124). A pesar de esto, en los ensayos de detección de AHLs con el biosensor *A. tumefaciens* NTL4 realizados en medios con bajo y alto Pi



(Figura 10), no se detectaron diferencias significativas entre las dos condiciones de fosfato tanto en las cepas mutantes como en la silvestre, con excepción de la fase exponencial de crecimiento (3 horas de incubación) donde la cepa silvestre mostró una mayor producción de AHLs en alto Pi y el mutante *ppk1* en bajo Pi. El método utilizado para la identificación de AHLs es cualitativo y habría que realizar otro tipo de estudios para poder cuantificar y confirmar las diferencias en la producción de estas moléculas por parte de los mutantes. Mediante esta técnica tampoco pudo detectarse con exactitud la presencia de C4-HSL en ninguna de las muestras, sin embargo si se observaron manchas con la misma migración de la oxo-C12-HSL en todas las cepas y condiciones, con menor intensidad a las 3 horas de incubación (en todas las cepas) que en tiempos posteriores, y es perceptible que la señal de esta lactona es menor en el mutante *ppk1* que en el mutante *ppk2* y en la cepa silvestre.

Debido a que estos resultados no son concluyentes, no puede extrapolarse la producción de factores de virulencia a la presencia de las distintas AHLs observadas. No obstante, se ha demostrado que, aunque es necesaria una concentración crítica de moléculas autoinducidas para la activación de este sistema, la expresión de algunos genes de virulencia como *lecA* están “super-regulados” de una forma dependiente de la fase de crecimiento más que por la concentración de AHLs (27). De igual forma, la producción de PQS -otra molécula de señalización que controla la síntesis de factores de virulencia como plicianina, lectina, ramnolípidos y HCN (26, 41)- demostró en un principio ser dependiente de LasR/oxo-C12-HSL (95). Sin embargo, luego se demostró que la concentración de PQS alcanza su máximo en la fase estacionaria tardía donde el sistema de QS no estaría activo, sugiriendo que esta molécula no participa en la detección de la densidad celular y puede activar la producción de factores de virulencia en respuesta a otros estímulos (76). Esto también fue probado *in vivo*, donde se

observó que bajas concentraciones de fosfato generan una mayor producción de PQS y del sideróforo pioverdina, que resultan en una mayor letalidad de *P. aeruginosa* frente a *C. elegans* (137). Consistentemente, se observó también en este estudio un aumento en la producción de sideróforos totales (Figura 8), y de pioverdina y piocianina (Figura 9) en la cepa silvestre y en ambos crecidos en bajo fosfato. La medición de estos factores de virulencia se realizó en distintas fases de crecimiento, por lo que se observó la progresión de la producción de sideróforos en el tiempo, destacando que en la cepa silvestre la producción es más baja a las 3 horas en ambos medios, lo que indicaría que la inducción en la producción de sideróforos ocurre alrededor de las 6 horas de incubación. El aumento en la producción de sideróforos en carencia de fosfato ha sido bien documentado (71, 137), por tanto el comportamiento de todas las cepas en este medio era esperable. Sin embargo, la producción de sideróforos totales fue varias veces mayor en el mutante *ppk2* que en el mutante *ppk1*, en comparación con la cepa silvestre. Además, la producción de sideróforos en este mutante aumentó progresivamente con el tiempo de incubación y a las 3 horas ya se observaba una gran cantidad de éstos, lo que sugiere una síntesis muy temprana de este factor de virulencia.

Por otro lado, en las mediciones espectrofotométricas (Figura 9) también se observó una producción significativamente mayor de pioverdina en el mutante *ppk2* en relación a las demás cepas, lo que es corroborado por el ensayo de proteómica cuantitativa, donde también se observó un aumento en la cantidad de proteínas relacionadas con la síntesis de pioverdina en comparación con la cepa silvestre (Tabla 6). Esto podría explicar en parte la mayor cantidad de sideróforos totales sugerido por el ensayo de difusión en agar CAS, debido a la alta afinidad por hierro de la pioverdina, aunque por ICPL también se observaron aumentadas otras proteínas asociadas con la captura e

ingreso de hierro a la célula, incluyendo la de síntesis de pioverdina PvdL (Tabla 6). Esto es de gran importancia ya que se asocia a la pioverdina con una mayor capacidad infectiva en distintos modelos animales y vegetales (80, 84), debido a su mayor capacidad de adquirir hierro en sistemas biológicos removiéndolo incluso de proteínas como la transferrina y la lactoferrina (130, 135), promoviendo de esta forma su crecimiento y colonización de tejidos como se ha demostrado en modelos de ratón quemado y de colonización de pulmón de rata (97, 105, 129). Adicionalmente, se ha encontrado que la pioverdina inicia una cascada de señalización que termina en la inducción de la síntesis de otros factores de virulencia como la exotoxina A, la endoproteasa PrpL y la misma pioverdina (68).

En el mutante *ppk1*, los resultados del ensayo de difusión en agar CAS (Figura 8) reflejaron una producción global de sideróforos indistinta de la cepa silvestre, mientras que la presencia de pioverdina, medida por espectrofotometría (Figura 9), es significativamente menor que en la cepa silvestre ( $P < 0,001$ ). La diferencia entre la medición de sideróforos totales y la de pioverdina sugieren que habría un aumento en la producción de otros compuestos capaces de quelar hierro, pudiendo ser uno de estos la pioquelina, un sideróforo secundario con menor afinidad por hierro (99). Esto fue confirmado por ICPL (Tabla 6), donde se observaron aumentos de la PchE y FptA, proteínas involucradas en la síntesis y el transporte de la pioquelina, respectivamente. Ambas proteínas, además de la PchF, se encontraron aumentadas en el mutante *ppk2*. Se ha considerado que la pioverdina es el principal mecanismo de transporte de hierro en la célula, ya que tiene una mayor capacidad de incorporar hierro de la pioquelina, (Pvd  $K_a = 10^{32} \text{ M}^{-1}$  versus Pch  $K_a = 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  en etanol) (1, 18). Sin embargo, al igual que la pioverdina, la pioquelina promueve el crecimiento bacteriano y puede remover



hierro de la transferrina y lactoferrina, además de actuar de forma sinérgica con la pioverdina para causar infección (19, 116, 122).

De la misma forma en que se evaluó la producción de pioverdina, se midieron las concentraciones de piocianina en los sobrenadantes de los cultivos de las distintas cepas (Figura 9). La piocianina es un pigmento tóxico derivado de fenazinas característico del género *Pseudomonas*, cuya acción se debe a sus propiedades redox que, en presencia de oxígeno y de agentes reductores como NADH y NADPH, genera la acumulación de peróxido de hidrógeno y de superóxido (48). Estudios revelan que altas concentraciones de piocianina generan una directa inhibición de las catalasas (89) y depleción intracelular de la forma reducida del glutatión, cuya acción sobre la piocianina produce radicales libres (83), activando procesos proinflamatorios que en conjunto estimulan la atracción de neutrófilos a las vías respiratorias, causando inflamación y daño tisular mediado por piocianina y sus derivados, especies reactivas de oxígeno y de los mismos neutrófilos (24, 43, 83). Por otro lado, la piocianina también puede actuar de forma sinérgica con la pioquelina, catalizando la formación del radical hidroxilo que daña directamente a las células endoteliales pulmonares (12, 81). Por estas razones la piocianina se ha utilizado como un determinante de la virulencia en *P. aeruginosa*, que permite tipificar a las cepas toxicogénicas (111).

La medición de piocianina en los sobrenadantes de cultivos de *P. aeruginosa* (Figura 9) reveló un aumento de la producción de piocianina en el tiempo, lo que se condice con la regulación de la producción de este compuesto por parte del sistema de QS. La cantidad de piocianina medida en la condición de bajo fosfato fue significativamente mayor en todas las cepas que en alto fosfato, comprobando la inducción de la expresión de genes involucrados en la síntesis de fenazinas en carencia de fosfato descrita anteriormente (4, 137). Por otro lado, en bajo fosfato la



producción de piocianina fue mayor en los mutantes *ppk1* y *ppk2* que en la cepa silvestre, sugiriendo que estos mutantes son más sensibles a la carencia de fosfato, o que algún otro sistema regula positivamente su producción en estas condiciones. Lamentablemente, no pudo identificarse por proteómica cuantitativa proteínas relacionadas con la síntesis de fenazinas en estos mutantes.

Recientemente, mediante experimentos de microarreglos de ADN en *P. aeruginosa* se reveló que además de la inducción en la producción de piocianina y pioverdina, la carencia de fosfato altera la transcripción de múltiples genes relacionados con la adquisición de fosfato (*pstSCAB-phoU*, *phoA*, *oprO*, *oprP*), el sistema de QS (*mvfR*, *pvdS*, *rhIR*), quimiotaxis (*ctpL*, *ctpH* y otros probables transductores de quimiotaxis) y secreción de toxinas (sistemas de secreción tipo II y VI), entre otros (4). Para la cepa silvestre, en la condición de carencia de fosfato utilizada para los ensayos de proteómica cuantitativa en este trabajo, también se observaron aumentadas proteínas relacionadas con la adquisición de fosfato (OprO, PstB, PstC y PhoU, Tabla 4). Sumado a esto, se encontraron disminuidas nucleósido difosfato quinasas (NDKs) y aumentada la Lon proteasa (Tablas suplementarias 1 y 2), lo que sugiere un estado general de déficit de nutrientes en la célula. En *E. coli* la hambruna de aminoácidos genera acumulación de poliP en la célula, lo cuales forman complejos con la proteasa Lon y gatillan la degradación de proteínas, lo que aumenta la disponibilidad de aminoácidos (66). Por otro lado, en *P. aeruginosa* se ha asociado la acción de la proteasa Lon con una disminución en la expresión del sistema de QS, lo que reprime directamente la expresión de LasR/LasI vía la degradación de la sintasa LasI (123). Esta observación del aumento de la proteasa Lon en carencia de fosfato, podría ser una explicación a la disminución en los niveles de AHL descritos anteriormente en esta condición (7, 53). En los mutantes *ppk1* y *ppk2* no se observó un claro aumento en

proteínas relacionadas con el metabolismo del fosfato, ya que la porina OprO se encontró disminuida en ambos mutantes, pero si aumentó el regulador PhoB en el mutante *ppk2*. En este mutante además se encontró una disminución de NDKs, pero no se detectó esta proteína en el mutante *ppk1*. Con respecto a la Lon proteasa, aunque se encontró aumentada, este aumento no es significativo en ninguna de los mutantes (Tablas suplementarias 3 y 4).

Finalmente, aunque las mediciones de sideróforos y piocianina sugieren una mayor virulencia del mutante *ppk2*, el ensayo de la virulencia *in vivo* permitió clarificar y comprobar lo observado en cuanto al efecto de estos factores de virulencia de las distintas cepas de *P. aeruginosa* en un modelo animal.

#### **4.2.1. Letalidad de *P. aeruginosa* en un modelo de infección por inmersión en el pez cebra**

En el presente estudio se demostró por primera vez que *P. aeruginosa* es capaz de causar letalidad en un modelo de infección por inmersión en el pez cebra. No obstante, debido a la característica oportunista del patógeno, tanto la bacteria como el pez deben encontrarse en condiciones específicas para que esto ocurra. Según la teoría del marco daño-respuesta en la patogénesis microbiana de A. Casadevall y L. Pirofski (14), la virulencia es una propiedad del microorganismo que sólo se expresa en un hospedero susceptible, y la patogénesis microbiana es el resultado de la interacción entre el microorganismo y el hospedero, y no es atribuible a ninguno de los componentes por separado. Esta teoría se ajusta especialmente a lo observado en *P. aeruginosa*, ya que la patogenicidad de esta bacteria, es decir la capacidad de causar daño en el hospedero, depende fuertemente del estado inmunológico del hospedero y de la virulencia bacteriana. Como se observó en este estudio, sólo se ocurrió daño o

muerte en condiciones específicas del pez cebra y de *P. aeruginosa*. Estas fueron un estadio temprano en el desarrollo del pez (3 dpf), en el cual sólo se encuentra desarrollado el sistema inmune innato; una baja temperatura de incubación (menor a 24°C), la cual contribuye a una respuesta inmune disminuida en el pez; una alta pero determinada carga bacteriana ( $\sim 5 \times 10^8$  UFC/mL), imprescindible para causar mortalidad en los tiempos observados, ya que concentraciones mayores conducen a una rápida muerte del pez en todas las cepas estudiadas (100% de muerte en media hora), y concentraciones menores no generan efecto alguno en la salud del pez incluso luego de 5 días post infección (datos no mostrados). Además, se pudo corroborar que la depleción de fosfato induce la virulencia en *P. aeruginosa* como se observó en las curvas de sobrevivencia de Kaplan-Meier (Figura 17), ya que la cepa silvestre de *P. aeruginosa* sólo generó mortalidad en la condición de bajo Pi (60% en bajo Pi versus 4% en alto Pi a las 28 hpi), lo que se había descrito anteriormente en otros modelos animales (71, 137),).

Por otro lado, se observó una marcada diferencia entre la letalidad de las cepas mutantes *ppk1* y *ppk2*, ya que la primera no generó una mortalidad superior al 10% en ambas condiciones de disponibilidad de fosfato, mientras que el mutante *ppk2* provocó un 100% de mortalidad antes de las 22 hpi en bajo Pi y a las 24 hpi en alto Pi. Esto sugiere que la carencia de fosfato no altera la virulencia de las cepas mutantes, ya que en carencia de fosfato se mantuvo la atenuación en la virulencia del mutante *ppk1* y la alta letalidad del mutante *ppk2*.

De acuerdo con los cambios fisiológicos observados en los ensayo de virulencia en el pez cebra, la diferencia en la letalidad de las cepas puede ser causada por la secreción o excreción de compuestos tóxicos para el pez, pudiendo ocurrir la muerte de las larvas sólo un par de horas luego de la infección en algunas condiciones. Según

lo observado en este estudio, los sideróforos son un buen candidato para explicar la diferencia en la toxicidad tanto de la cepa silvestre en bajo fosfato, como la de las cepas mutantes. Como ya se mencionó anteriormente, la producción de sideróforos totales en el mutante *ppk2* es superior a la del mutante *ppk1* y de la cepa silvestre, lo que se correlaciona con la mayor letalidad de ese mutante. Sin embargo, el mutante *ppk1* presentó una producción de sideróforos totales similar a la cepa silvestre, e incluso una mayor cantidad de piocianina. Contrariamente, la producción de pioverdina de este mutante fue significativamente menor que la observada en las otras cepas, siendo notoria la alta producción de pioverdina por el mutante *ppk2*. En base a esto, la mortalidad generada en los peces podría ser causa de una acción sinérgica principalmente de la pioverdina con otros sideróforos (como con pioquelina cuyas proteínas de síntesis se encontraron aumentadas en el mutante *ppk2*) y la piocianina, los cuales se encontraron aumentados en las condiciones más virulentas. En concordancia, en las condiciones donde hubo una baja producción de pioverdina (como en la cepa silvestre en alto Pi y en el mutante *ppk1*), la letalidad de las cepas se vio atenuada.

Estos estudios abren el camino para el uso del pez cebra como un modelo para evaluar la virulencia de bacterias oportunistas como *P. aeruginosa*, utilizando técnicas no invasivas para el pez. Además, la infección por inmersión permite escalar los estudios a ensayos de rastreo masivo de mutaciones que atenúen la virulencia de distintos microorganismos patógenos.



## 5. CONCLUSIONES

- Las mutaciones en los genes *ppk1* y *ppk2* generan efectos similares a nivel metabólico, lo que se observó tanto en los resultados de los microarreglos fenotípicos como en la proteómica cuantitativa, mientras que mostraron comportamientos distintos en relación a la virulencia bacteriana, observable en la producción de factores de virulencia y los ensayos de infección en el pez cebra.
- Los mutantes de la síntesis de los polifosfatos en *P. aeruginosa* presentan pocos cambios en relación a la cepa silvestre en la utilización de distintos nutrientes (fuentes de C, N, P, S), lo que sugiere que los cambios en el metabolismo central provocados por mutaciones individuales (del gen *ppk1* o del gen *ppk2*) son compensados por la función del otro gen parálogo del metabolismo de los poliP.
- Las mutaciones en la síntesis de los poliP en *P. aeruginosa* generan un aumento en la sensibilidad a los antibióticos y a otros agentes tóxicos, la cual se correlaciona con cambios en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de la membrana y la pared celular, transportadores y porinas, y bombas de eflujo del tipo MexEF-OprN reguladas por MvaT.
- La carencia de fosfato en los mutantes *ppk1* y *ppk2* genera efectos distintos a los observados en la cepa silvestre, ya que en ellos no se encontró un aumento consistente de los sistemas de ingreso de fosfato a la célula, la producción de pirocianina fue mayor en ambos mutantes que en la cepa silvestre, y sólo en el mutante *ppk2* se observó una mayor producción de los sideróforos totales,

destacándose la baja producción de pioverdina en el mutante *ppk1* y la alta producción de esta en el mutante *ppk2* en relación a la cepa silvestre.

- *P. aeruginosa* PAO1 genera mortalidad en el modelo de infección por inmersión en el pez cebra, lo que permite el uso de este método para distinguir la letalidad de distintas cepas y/o condiciones de crecimiento, como se observó en la cepa silvestre crecida en alto y bajo fosfato.
- El mutante *ppk1* presentó una atenuación en la letalidad en el pez cebra, mientras que el mutante *ppk2* generó una gran mortalidad (superior que la de la cepa silvestre) en ambas condiciones de disponibilidad de fosfato, lo que se correlaciona con la baja producción de pioverdina en el mutante *ppk1* y la alta producción de este sideróforo en el mutante *ppk2*.
- Este estudio confirma al gen *ppk1* como un buen blanco para el uso de drogas antimicrobianas, debido a su baja letalidad en el pez cebra, baja producción de pioverdina y alta sensibilidad a antibióticos, pero no así al gen *ppk2*, ya que en este mutante se ve un aumento de la letalidad en el modelo animal estudiado y una aumento de la producción de los factores de virulencia evaluados.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. **Albrechtgary, A. M., S. Blanc, N. Rochel, A. Z. Ocaktan, and M. A. Abdallah.** 1994. Bacterial Iron Transport - Coordination Properties of Pyoverdine Paa, a Peptidic Siderophore of *Pseudomonas-Aeruginosa*. *Inorganic Chemistry* **33**:6391-6402.
2. **Alonso, A., E. Campanario, and J. L. Martinez.** 1999. Emergence of multidrug-resistant mutants is increased under antibiotic selective pressure in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **145** ( Pt 10):2857-62.
3. **Andrea Johnová, M. D., Mohamed A. Abdallah & PavelKyslík.** 2001. Overproduction of Pyoverdins by Fur mutants of *Pseudomonas aeruginosa* strains PAO1 and Fe10 in stirred bioreactor. *Biotechnology Letters* **23**:1759-1763.
4. **Bains, M., L. Fernandez, and R. E. Hancock.** 2012. Phosphate Starvation Promotes Swarming Motility and Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **78**:6762-8.
5. **Barie, P. S.** 2012. Multidrug-resistant organisms and antibiotic management. *Surg Clin North Am* **92**:345-91, ix-x.
6. **Bates, J. M., E. Mittge, J. Kuhlman, K. N. Baden, S. E. Cheesman, and K. Guillemin.** 2006. Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. *Dev Biol* **297**:374-86.
7. **Bazire, A., A. Dheilly, F. Diab, D. Morin, M. Jebbar, D. Haras, and A. Dufour.** 2005. Osmotic stress and phosphate limitation alter production of cell-to-cell signal molecules and rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **253**:125-31.
8. **Bertani, I., and V. Venturi.** 2004. Regulation of the N-acyl homoserine lactone-dependent quorum-sensing system in rhizosphere *Pseudomonas putida* WCS358 and cross-talk with the stationary-phase RpoS sigma factor and the global regulator GacA. *Appl Environ Microbiol* **70**:5493-502.
9. **Blevés, S., C. Soscia, P. Nogueira-Orlandi, A. Lazdunski, and A. Filloux.** 2005. Quorum sensing negatively controls type III secretion regulon expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **187**:3898-902.
10. **Bochner, B. R.** 2001. Phenotype MicroArrays for High-Throughput Phenotypic Testing and Assay of Gene Function. *Genome Research* **11**:1246-1255.
11. **Brannon, M. K., J. M. Davis, J. R. Mathias, C. J. Hall, J. C. Emerson, P. S. Crosier, A. Huttenlocher, L. Ramakrishnan, and S. M. Moskowitz.** 2009. *Pseudomonas aeruginosa* Type III secretion system interacts with phagocytes to modulate systemic infection of zebrafish embryos. *Cell Microbiol* **11**:755-68.
12. **Britigan, B. E., G. T. Rasmussen, and C. D. Cox.** 1997. Augmentation of oxidant injury to human pulmonary epithelial cells by the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyochelin. *Infect Immun* **65**:1071-6.
13. **Cao, H., G. Krishnan, B. Goumnerov, J. Tsongalis, R. Tompkins, and L. G. Rahme.** 2001. A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas*



- aeruginosa encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:14613-8.
14. **Casadevall, A., and L. A. Pirofski.** 2003. The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* **1**:17-24.
  15. **Castang, S., H. R. McManus, K. H. Turner, and S. L. Dove.** 2008. H-NS family members function coordinately in an opportunistic pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:18947-52.
  16. **Clatworthy, A. E., J. S. Lee, M. Leibman, Z. Kostun, A. J. Davidson, and D. T. Hung.** 2009. *Pseudomonas aeruginosa* infection of zebrafish involves both host and pathogen determinants. *Infect Immun* **77**:1293-303.
  17. **Cox, C. D.** 1986. Role of pyocyanin in the acquisition of iron from transferrin. *Infect Immun* **52**:263-70.
  18. **Cox, C. D., and R. Graham.** 1979. Isolation of an iron-binding compound from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **137**:357-64.
  19. **Cox, C. D., K. L. Rinehart, Jr., M. L. Moore, and J. C. Cook, Jr.** 1981. Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**:4256-60.
  20. **Chang, M. X., and P. Nie.** 2008. RNAi suppression of zebrafish peptidoglycan recognition protein 6 (zfPGRP6) mediated differentially expressed genes involved in Toll-like receptor signaling pathway and caused increased susceptibility to *Flavobacterium columnare*. *Vet Immunol Immunopathol* **124**:295-301.
  21. **Chemani, C., A. Imberty, S. de Bentzmann, M. Pierre, M. Wimmerova, B. P. Guery, and K. Faure.** 2009. Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands. *Infect Immun* **77**:2065-75.
  22. **Davis, J. M., H. Clay, J. L. Lewis, N. Ghori, P. Herbomel, and L. Ramakrishnan.** 2002. Real-time visualization of mycobacterium-macrophage interactions leading to initiation of granuloma formation in zebrafish embryos. *Immunity* **17**:693-702.
  23. **de Kievit, T., P. C. Seed, J. Nezezon, L. Passador, and B. H. Iglewski.** 1999. RsaL, a novel repressor of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**:2175-84.
  24. **Denning, G. M., L. A. Wollenweber, M. A. Railsback, C. D. Cox, L. L. Stoll, and B. E. Britigan.** 1998. *Pseudomonas* pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. *Infect Immun* **66**:5777-84.
  25. **Deziel, E., S. Gopalan, A. P. Tampakaki, F. Lepine, K. E. Padfield, M. Saucier, G. Xiao, and L. G. Rahme.** 2005. The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting lasRI, rhIRI or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. *Mol Microbiol* **55**:998-1014.
  26. **Diggle, S. P., K. Winzer, S. R. Chhabra, K. E. Worrall, M. Camara, and P. Williams.** 2003. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy,



- regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of *LasR*. *Mol Microbiol* **50**:29-43.
27. **Diggle, S. P., K. Winzer, A. Lazdunski, P. Williams, and M. Camara.** 2002. Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: *MvaT* and the regulation of *N*-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *J Bacteriol* **184**:2576-86.
  28. **Driscoll, J. A., S. L. Brody, and M. H. Kollef.** 2007. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* **67**:351-68.
  29. **Eberhard, A.** 1972. Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *J Bacteriol* **109**:1101-5.
  30. **Eberhard, A., A. L. Burlingame, C. Eberhard, G. L. Kenyon, K. H. Neilson, and N. J. Oppenheimer.** 1981. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* **20**:2444-9.
  31. **Encinas, P., M. A. Rodriguez-Milla, B. Novoa, A. Estepa, A. Figueras, and J. Coll.** 2010. Zebrafish fin immune responses during high mortality infections with viral haemorrhagic septicemia rhabdovirus. A proteomic and transcriptomic approach. *BMC Genomics* **11**:518.
  32. **Entner, N., and R. Y. Stanier.** 1951. Studies on the oxidation of glucose by *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* **62**:181-6.
  33. **Eschbach, M., K. Schreiber, K. Trunk, J. Buer, D. Jahn, and M. Schobert.** 2004. Long-Term Anaerobic Survival of the Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via Pyruvate Fermentation. *Journal of Bacteriology* **186**:4596-4604.
  34. **Farah, C., M. Vera, D. Morin, D. Haras, C. Jerez, and N. Guiliani.** 2005. Evidence for a functional quorum-sensing type AI-1 system in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* **71**:7033-40.
  35. **Firoved, A. M., and V. Deretic.** 2003. Microarray analysis of global gene expression in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **185**:1071-81.
  36. **Fraley, C., M. Rashid, S. Lee, R. Gottschalk, J. Harrison, P. Wood, M. Brown, and A. Kornberg.** 2007. A polyphosphate kinase 1 (*ppk1*) mutant of *Pseudomonas aeruginosa* exhibits multiple ultrastructural and functional defects. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:3526-31.
  37. **Frimmersdorf, E., S. Horatzek, A. Pelnikevich, L. Wiehlmann, and D. Schomburg.** 2010. How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach. *Environmental Microbiology* **12**:1734-1747.
  38. **Fuqua, C., and E. P. Greenberg.** 1998. Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. *Curr Opin Microbiol* **1**:183-9.
  39. **Fuqua, C., S. C. Winans, and E. P. Greenberg.** 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the *LuxR-LuxI* family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **50**:727-51.
  40. **Fuqua, W. C., S. C. Winans, and E. P. Greenberg.** 1994. Quorum sensing in bacteria: the *LuxR-LuxI* family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**:269-75.

41. **Gallagher, L. A., S. L. McKnight, M. S. Kuznetsova, E. C. Pesci, and C. Manoil.** 2002. Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **184**:6472-80.
42. **Gambello, M. J., S. Kaye, and B. H. Iglewski.** 1993. LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infect Immun* **61**:1180-4.
43. **Ginn-Pease, M. E., and R. L. Whisler.** 1998. Redox signals and NF-kappaB activation in T cells. *Free Radic Biol Med* **25**:346-61.
44. **Goldbourn, A., L. A. Day, and A. E. McDermott.** 2007. Assignment of congested NMR spectra: Carbonyl backbone enrichment via the Entner-Doudoroff pathway. *Journal of Magnetic Resonance* **189**:157-165.
45. **Hanahan, D. (ed.).** 1985. Techniques for transformation of *E. coli*, vol. DNA cloning: a practical approach, vol. 1. IRL Press, McLean, VA.
46. **Hancock, R. E.** 1986. Intrinsic antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **18**:653-6.
47. **Hare, N. J., N. Solis, C. Harmer, N. B. Marzook, B. Rose, C. Harbour, B. Crossett, J. Manos, and S. J. Cordwell.** 2012. Proteomic profiling of *Pseudomonas aeruginosa* AES-1R, PAO1 and PA14 reveals potential virulence determinants associated with a transmissible cystic fibrosis-associated strain. *BMC Microbiol* **12**:16.
48. **Hassan, H. M., and I. Fridovich.** 1980. Mechanism of the antibiotic action pyocyanine. *J Bacteriol* **141**:156-63.
49. **Hegedus, Z., A. Zakrzewska, V. C. Agoston, A. Ordas, P. Racz, M. Mink, H. P. Spaink, and A. H. Meijer.** 2009. Deep sequencing of the zebrafish transcriptome response to mycobacterium infection. *Mol Immunol* **46**:2918-30.
50. **Hickey, W. J., and D. D. Focht.** 1990. Degradation of mono-, di-, and trihalogenated benzoic acids by *Pseudomonas aeruginosa* JB2. *Appl Environ Microbiol* **56**:3842-50.
51. **Ishige, K., H. Zhang, and A. Kornberg.** 2002. Polyphosphate kinase (PPK2), a potent, polyphosphate-driven generator of GTP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:16684-8.
52. **Jacobs, M. A.** 2003. Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**:14339-14344.
53. **Jensen, V., D. Lons, C. Zaoui, F. Bredenbruch, A. Meissner, G. Dieterich, R. Munch, and S. Haussler.** 2006. RhlR expression in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the *Pseudomonas* quinolone signal via PhoB-dependent and -independent pathways. *J Bacteriol* **188**:8601-6.
54. **Jones, S., B. Yu, N. J. Bainton, M. Birdsall, B. W. Bycroft, S. R. Chhabra, A. J. Cox, P. Golby, P. J. Reeves, S. Stephens, and et al.** 1993. The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *EMBO J* **12**:2477-82.
55. **Kassem, II, and G. Rajashekara.** 2011. An ancient molecule in a recalcitrant pathogen: the contributions of poly-P to the pathogenesis and stress responses of *Campylobacter jejuni*. *Future Microbiol* **6**:1117-20.



56. **Kim, K., N. Rao, C. Fraley, and A. Kornberg.** 2002. Inorganic polyphosphate is essential for long-term survival and virulence factors in *Shigella* and *Salmonella* spp. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:7675-80.
57. **Kim, K. S., N. N. Rao, C. D. Fraley, and A. Kornberg.** 2002. Inorganic polyphosphate is essential for long-term survival and virulence factors in *Shigella* and *Salmonella* spp. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:7675-80.
58. **Klockgether, J., A. Munder, J. Neugebauer, C. F. Davenport, F. Stanke, K. D. Larbig, S. Heeb, U. Schock, T. M. Pohl, L. Wiehlmann, and B. Tummler.** 2010. Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 laboratory strains. *J Bacteriol* **192**:1113-21.
59. **Kohler, T., S. F. Epp, L. K. Curty, and J. C. Pechere.** 1999. Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**:6300-5.
60. **Kohler, T., M. Michea-Hamzehpour, U. Henze, N. Gotoh, L. K. Curty, and J. C. Pechere.** 1997. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **23**:345-54.
61. **Kohler, T., M. Michea-Hamzehpour, P. Plesiat, A. L. Kahr, and J. C. Pechere.** 1997. Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:2540-3.
62. **Kornberg, A.** 1999. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Prog Mol Subcell Biol* **23**:1-18.
63. **Kornberg, A., S. R. Kornberg, and E. S. Simms.** 1956. Metaphosphate synthesis by an enzyme from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **20**:215-27.
64. **Kornberg, A., N. Rao, and D. Ault-Riché.** 1999. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu Rev Biochem* **68**:89-125.
65. **Kumar, A., and H. P. Schweizer.** 2011. Evidence of MexT-independent overexpression of MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* in presence of metabolic stress. *PLoS One* **6**:e26520.
66. **Kuroda, A.** 2006. A polyphosphate-Ion protease complex in the adaptation of *Escherichia coli* to amino acid starvation. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**:325-31.
67. **Kuroda, A., and A. Kornberg.** 1997. Polyphosphate kinase as a nucleoside diphosphate kinase in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:439-42.
68. **Lamont, I. L., P. A. Beare, U. Ochsner, A. I. Vasil, and M. L. Vasil.** 2002. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:7072-7077.
69. **Latifi, A., M. Foglino, K. Tanaka, P. Williams, and A. Lazdunski.** 1996. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* **21**:1137-46.
70. **Ledgham, F., I. Ventre, C. Soscia, M. Foglino, J. N. Sturgis, and A. Lazdunski.** 2003. Interactions of the quorum sensing regulator QscR: interaction

- with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhIR. *Mol Microbiol* **48**:199-210.
71. **Long, J., O. Zaborina, C. Holbrook, A. Zaborin, and J. Alverdy.** 2008. Depletion of intestinal phosphate after operative injury activates the virulence of *P aeruginosa* causing lethal gut-derived sepsis. *Surgery* **144**:189-97.
  72. **Ludwig, M., N. Palha, C. Torhy, V. Briolat, E. Colucci-Guyon, M. Bremont, P. Herbomel, P. Boudinot, and J. P. Levraud.** 2011. Whole-body analysis of a viral infection: vascular endothelium is a primary target of infectious hematopoietic necrosis virus in zebrafish larvae. *PLoS Pathog* **7**:e1001269.
  73. **Luo, Z. Q., T. E. Clemente, and S. K. Farrand.** 2001. Construction of a derivative of *Agrobacterium tumefaciens* C58 that does not mutate to tetracycline resistance. *Mol Plant Microbe Interact* **14**:98-103.
  74. **Marin, M. M., L. Yuste, and F. Rojo.** 2003. Differential Expression of the Components of the Two Alkane Hydroxylases from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **185**:3232-3237.
  75. **Mavrodi, D. V., R. F. Bonsall, S. M. Delaney, M. J. Soule, G. Phillips, and L. S. Thomashow.** 2001. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **183**:6454-65.
  76. **McKnight, S. L., B. H. Iglewski, and E. C. Pesci.** 2000. The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**:2702-8.
  77. **Meeker, N. D., and N. S. Trede.** 2008. Immunology and zebrafish: spawning new models of human disease. *Dev Comp Immunol* **32**:745-57.
  78. **Meijer, A. H., and H. P. Spaijk.** 2011. Host-pathogen interactions made transparent with the zebrafish model. *Curr Drug Targets* **12**:1000-17.
  79. **Mendelson, M. H., A. Gurtman, S. Szabo, E. Neibart, B. R. Meyers, M. Policar, T. W. Cheung, D. Lillienfeld, G. Hammer, S. Reddy, and et al.** 1994. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients with AIDS. *Clin Infect Dis* **18**:886-95.
  80. **Meyer, J. M., A. Neely, A. Stintzi, C. Georges, and I. A. Holder.** 1996. Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **64**:518-23.
  81. **Miller, R. A., G. T. Rasmussen, C. D. Cox, and B. E. Britigan.** 1996. Protease cleavage of iron-transferrin augments pyocyanin-mediated endothelial cell injury via promotion of hydroxyl radical formation. *Infect Immun* **64**:182-8.
  82. **Morin, D., B. Grasland, K. Vallee-Rehel, C. Dufau, and D. Haras.** 2003. On-line high-performance liquid chromatography-mass spectrometric detection and quantification of N-acylhomoserine lactones, quorum sensing signal molecules, in the presence of biological matrices. *J Chromatogr A* **1002**:79-92.
  83. **Muller, M.** 2002. Pyocyanin induces oxidative stress in human endothelial cells and modulates the glutathione redox cycle. *Free Radic Biol Med* **33**:1527-33.
  84. **Nadal Jimenez, P., G. Koch, E. Papaioannou, M. Wahjudi, J. Krzeslak, T. Coenye, R. H. Cool, and W. J. Quax.** 2010. Role of PvdQ in *Pseudomonas aeruginosa* virulence under iron-limiting conditions. *Microbiology* **156**:49-59.



85. **Nealson, K. H., T. Platt, and J. W. Hastings.** 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* **104**:313-22.
86. **Nikaido, H.** 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* **264**:382-8.
87. **Nocek, B., S. Kochinyan, M. Proudfoot, G. Brown, E. Evdokimova, J. Osipiuk, A. M. Edwards, A. Savchenko, A. Joachimiak, and A. F. Yakunin.** 2008. Polyphosphate-dependent synthesis of ATP and ADP by the family-2 polyphosphate kinases in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:17730-5.
88. **Novoa, B., A. Romero, V. Mulero, I. Rodriguez, I. Fernandez, and A. Figueras.** 2006. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for the study of vaccination against viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Vaccine* **24**:5806-16.
89. **O'Malley, Y. Q., K. J. Reszka, D. R. Spitz, G. M. Denning, and B. E. Britigan.** 2004. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **287**:L94-103.
90. **Paradela, A., M. Marcilla, R. Navajas, L. Ferreira, A. Ramos-Fernandez, M. Fernández, J. F. Mariscotti, F. García-del Portillo, and J. P. Albar.** 2010. Evaluation of isotope-coded protein labeling (ICPL) in the quantitative analysis of complex proteomes. *Talanta* **80**:1496-502.
91. **Parks, Q., and J. Hobden.** 2005. Polyphosphate kinase 1 and the ocular virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**:248-51.
92. **Passador, L., J. M. Cook, M. J. Gambello, L. Rust, and B. H. Iglewski.** 1993. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* **260**:1127-30.
93. **Pearson, J. P., M. Feldman, B. H. Iglewski, and A. Prince.** 2000. *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. *Infect Immun* **68**:4331-4.
94. **Pearson, J. P., K. M. Gray, L. Passador, K. D. Tucker, A. Eberhard, B. H. Iglewski, and E. P. Greenberg.** 1994. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:197-201.
95. **Pesci, E. C., J. B. Milbank, J. P. Pearson, S. McKnight, A. S. Kende, E. P. Greenberg, and B. H. Iglewski.** 1999. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:11229-34.
96. **Phennicie, R. T., M. J. Sullivan, J. T. Singer, J. A. Yoder, and C. H. Kim.** 2010. Specific resistance to *Pseudomonas aeruginosa* infection in zebrafish is mediated by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Infect Immun* **78**:4542-50.
97. **Poole, K., C. Dean, D. Heinrichs, S. Neshat, K. Krebes, L. Young, and L. Kilburn.** 1996. Siderophore-mediated iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Biology of Pseudomonads*:371-383.
98. **Pruitt, B. A., Jr., A. T. McManus, S. H. Kim, and C. W. Goodwin.** 1998. Burn wound infections: current status. *World J Surg* **22**:135-45.

99. **Quadri, L. E., T. A. Keating, H. M. Patel, and C. T. Walsh.** 1999. Assembly of the *Pseudomonas aeruginosa* nonribosomal peptide siderophore pyochelin: In vitro reconstitution of aryl-4, 2-bisthiazoline synthetase activity from PchD, PchE, and PchF. *Biochemistry* **38**:14941-54.
100. **Rao, N., and A. Kornberg.** 1999. Inorganic polyphosphate regulates responses of *Escherichia coli* to nutritional stringencies, environmental stresses and survival in the stationary phase. *Prog Mol Subcell Biol* **23**:183-95.
101. **Rao, N., and A. Kornberg.** 1996. Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary-phase *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**:1394-400.
102. **Rao, N. N., M. R. Gomez-Garcia, and A. Kornberg.** 2009. Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. *Annu Rev Biochem* **78**:605-47.
103. **Rashid, M., and A. Kornberg.** 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:4885-90.
104. **Rashid, M., N. Rao, and A. Kornberg.** 2000. Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. *J Bacteriol* **182**:225-7.
105. **Rashid, M., K. Rumbaugh, L. Passador, D. Davies, A. Hamood, B. Iglewski, and A. Kornberg.** 2000. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:9636-41.
106. **Roychoudhury, S., K. Sakai, and A. M. Chakrabarty.** 1992. AlgR2 is an ATP/GTP-dependent protein kinase involved in alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:2659-63.
107. **Schweizer, H. P.** 2003. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res* **2**:48-62.
108. **Seet, Q., and L. H. Zhang.** 2011. Anti-activator QslA defines the quorum sensing threshold and response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **80**:951-65.
109. **Seufferheld, M., H. Alvarez, and M. Farias.** 2008. Role of polyphosphates in microbial adaptation to extreme environments. *Appl Environ Microbiol* **74**:5867-74.
110. **Shaw, P. D., G. Ping, S. L. Daly, C. Cha, J. E. Cronan, Jr., K. L. Rinehart, and S. K. Farrand.** 1997. Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:6036-41.
111. **Shi, H., Q. Trinh, W. Xu, B. Zhai, Y. Luo, and K. Huang.** 2012. A universal primer multiplex PCR method for typing of toxinogenic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* **95**:1579-87.
112. **Shin, S. H., Y. Lim, S. E. Lee, N. W. Yang, and J. H. Rhee.** 2001. CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. *J Microbiol Methods* **44**:89-95.
113. **Siehnel, R., B. Traxler, D. D. An, M. R. Parsek, A. L. Schaefer, and P. K. Singh.** 2010. A unique regulator controls the activation threshold of quorum-



- regulated genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:7916-21.
114. **Smith, R. S., and B. H. Iglewski.** 2003. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol* **6**:56-60.
  115. **Smith, R. S., and B. H. Iglewski.** 2003. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. *J Clin Invest* **112**:1460-5.
  116. **Sriyosachati, S., and C. D. Cox.** 1986. Siderophore-mediated iron acquisition from transferrin by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **52**:885-91.
  117. **Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrenner, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. Hancock, S. Lory, and M. V. Olson.** 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**:959-64.
  118. **Suga, H., and K. M. Smith.** 2003. Molecular mechanisms of bacterial quorum sensing as a new drug target. *Curr Opin Chem Biol* **7**:586-91.
  119. **Sullivan, C., and C. H. Kim.** 2008. Zebrafish as a model for infectious disease and immune function. *Fish Shellfish Immunol* **25**:341-50.
  120. **Sureka, K., S. Dey, P. Datta, A. Singh, A. Dasgupta, S. Rodrigue, J. Basu, and M. Kundu.** 2007. Polyphosphate kinase is involved in stress-induced mprAB-sigE-rel signalling in mycobacteria. *Mol Microbiol* **65**:261-76.
  121. **Sureka, K., S. Sanyal, J. Basu, and M. Kundu.** 2009. Polyphosphate kinase 2: a modulator of nucleoside diphosphate kinase activity in mycobacteria. *Mol Microbiol* **74**:1187-97.
  122. **Takase, H., H. Nitandai, K. Hoshino, and T. Otani.** 2000. Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice. *Infect Immun* **68**:1834-9.
  123. **Takaya, A., F. Tabuchi, H. Tsuchiya, E. Isogai, and T. Yamamoto.** 2008. Negative regulation of quorum-sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* by ATP-dependent Lon protease. *J Bacteriol* **190**:4181-8.
  124. **Tinsley, C. R., and E. C. Gotschlich.** 1995. Cloning and characterization of the meningococcal polyphosphate kinase gene: production of polyphosphate synthesis mutants. *Infect Immun* **63**:1624-30.
  125. **Toder, D. S., M. J. Gambello, and B. H. Iglewski.** 1991. *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase under the transcriptional control of lasR. *Mol Microbiol* **5**:2003-10.
  126. **Vallet, I., S. P. Diggle, R. E. Stacey, M. Camara, I. Ventre, S. Lory, A. Lazdunski, P. Williams, and A. Filloux.** 2004. Biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*: fimbrial cup gene clusters are controlled by the transcriptional regulator MvaT. *J Bacteriol* **186**:2880-90.
  127. **van der Sar, A. M., R. J. Musters, F. J. van Eeden, B. J. Appelmelk, C. M. Vandenbroucke-Grauls, and W. Bitter.** 2003. Zebrafish embryos as a model host for the real time analysis of *Salmonella typhimurium* infections. *Cell Microbiol* **5**:601-11.

128. **van Soest, J. J., O. W. Stockhammer, A. Ordas, G. V. Bloemberg, H. P. Spaink, and A. H. Meijer.** 2011. Comparison of static immersion and intravenous injection systems for exposure of zebrafish embryos to the natural pathogen *Edwardsiella tarda*. *BMC Immunol* **12**:58.
129. **Vogt, S. L., C. Green, K. M. Stevens, B. Day, D. L. Erickson, D. E. Woods, and D. G. Storey.** 2011. The stringent response is essential for *Pseudomonas aeruginosa* virulence in the rat lung agar bead and *Drosophila melanogaster* feeding models of infection. *Infect Immun* **79**:4094-104.
130. **Wendenbaum, S., P. Demange, A. Dell, J. M. Meyer, and M. A. Abdallah.** 1983. The structure of pyoverdinePa, the siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Tetrahedron Lett.* **24**:4877-4880.
131. **Westfall, L. W., N. L. Carty, N. Layland, P. Kuan, J. A. Colmer-Hamood, and A. N. Hamood.** 2006. *mvaT* mutation modifies the expression of the *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux operon *mexEF-oprN*. *FEMS Microbiol Lett* **255**:247-54.
132. **Winson, M. K., M. Camara, A. Latifi, M. Foglino, S. R. Chhabra, M. Daykin, M. Bally, V. Chapon, G. P. Salmond, B. W. Bycroft, and et al.** 1995. Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:9427-31.
133. **Winsor, G. L., D. K. Lam, L. Fleming, R. Lo, M. D. Whiteside, N. Y. Yu, R. E. Hancock, and F. S. Brinkman.** 2011. *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic Acids Res* **39**:D596-600.
134. **Wood, H. G., and J. E. Clark.** 1988. Biological aspects of inorganic polyphosphates. *Annu Rev Biochem* **57**:235-60.
135. **Xiao, R., and W. S. Kisaalita.** 1997. Iron acquisition from transferrin and lactoferrin by *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine. *Microbiology* **143** ( Pt 7):2509-15.
136. **Yang, L., M. Nilsson, M. Gjermansen, M. Givskov, and T. Tolker-Nielsen.** 2009. Pyoverdine and PQS mediated subpopulation interactions involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Mol Microbiol* **74**:1380-92.
137. **Zaborin, A., K. Romanowski, S. Gerdes, C. Holbrook, F. Lepine, J. Long, V. Poroyko, S. P. Diggle, A. Wilke, K. Righetti, I. Morozova, T. Babrowski, D. C. Liu, O. Zaborina, and J. C. Alverdy.** 2009. Red death in *Caenorhabditis elegans* caused by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:6327-32.
138. **Zhang, H., K. Ishige, and A. Kornberg.** 2002. A polyphosphate kinase (PPK2) widely conserved in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:16678-83.



## 7. ANEXOS

**Tabla suplementaria 1. Listado de proteínas que aumentan su expresión en *P. aeruginosa* PAO1 silvestre crecida en carencia de fosfato con respecto a la condición de exceso de fosfato en los análisis de proteómica cuantitativa.** Se muestran sólo las proteínas que pertenecen a las categorías funcionales de proteínas de transporte, transcripción, modificaciones postraduccionales, degradación de proteínas y chaperonas, biogénesis de pared celular/membrana/envoltura, motilidad celular y secreción, adaptación a condiciones atípicas y factores de virulencia.

Aumento de la expresión en ↓Pi en comparación con ↑Pi									
Categoría	Proteína	Gen	ORF	Puntuación	% Cob.	# Pépt.	# (L/H)	Prom.	log <sub>2</sub> (Prom-mediana)
<b>METABOLISMO</b>									
Proteínas de transporte	Porina O	<i>oprO</i>	PA3280	895,51	41,6	51	23	7,64	3,01
	Proteína de importación de fosfato y unión a ATP PstB	<i>pstB</i>	PA5366	114,41	26,0	8	5	5,19	2,45
	Componente de membrana del complejo de transporte específico de fosfato	<i>pstC</i>	PA5368	66,91	8,1	5	3	4,88	2,36
	Proteína reguladora del sistema de transporte de fosfato PhoU	<i>phoU</i>	PA5365	54,41	16,5	2	2	3,74	1,98
	Proteína de resistencia a multidroga MexA	<i>mexA</i>	PA0425	81,77	11,7	5	5	1,74	0,873
<b>ALMACENAJE Y PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN</b>									
Transcripción	Regulador transcripcional MvaT, subunidad P16	<i>mvaT</i>	PA4315	121,38	23,4	4	2	4,58	2,27
	Factor de terminación de la transcripción Rho	<i>rho</i>	PA5239	63,91	6,0	2	2	1,90	1
<b>PROCESOS CELULARES Y SEÑALIZACIÓN</b>									
Modificaciones postraduccionales, degradación de proteínas, chaperonas	Subunidad de unión a ATP de la proteasa Clp dependiente de ATP, ClpX	<i>clpX</i>	PA1802	63,47	14,8	4	3	2,77	1,54
	Subunidad de unión a ATP de probable proteasa ClpA/B		PA0459	497,10	30,6	28	22	2,38	1,32



	Chaperona ClpB	<i>clpB</i>	PA4542	231,40	21,3	22	13	2,33	1,29
	Subunidad proteasa HflK	<i>hflK</i>	PA4942	51,80	12,0	3	2	2,01	1,08
	Zinc metaloproteasa dependiente de ATP FtsH	<i>ftsH</i>	PA4751	70,42	6,7	3	2	1,73	0,865
	Lon proteasa	<i>lon</i>	PA1803	69,42	12,7	10	6	1,68	0,822
Biogénesis de pared celular /membrana /envoltura	Similar a UDP-glucosa /GDP-manosa deshidrogenasa	<i>wbpA</i>	PA3159	50,35	11,7	4	3	3,89	2,03
	Lipotoxina F, LptF	<i>lptF</i>	PA3692	88,51	10,7	4	3	2,59	1,45
	Proteína determinante de forma de barra MreB	<i>mreB</i>	PA4481	71,52	13,0	4	3	2,00	1,07
Motilidad celular y secreción	Probable ATPasa de vía de secreción		PA5210	48,89	3,5	3	2	2,99	1,85
	Translocasa subunidad secA	<i>secA</i>	PA4403	48,23	7,2	5	3	2,44	1,36
	Lectina de unión a fucosa PA-III	<i>lecB</i>	PA3361	45,52	11,3	4	2	1,75	0,881
	Proteína acomodadora CupA3	<i>cupA3</i>	PA2130	41,29	3,1	3	3	1,65	0,796
Adaptación a condiciones atípicas	Probable alquil hidropéroxido reductasa		PA0848	62,30	19,6	4	3	3,42	1,85
	Probable proteína de choque frío		PA0456	57,93	40,6	8	4	1,90	1
	Probable peroxidasa		PA3529	193,12	50,0	16	13	1,71	0,848
Factores de virulencia	Proteína reguladora de la transcripción AlgP	<i>algP</i>	PA5253	193,71	12,2	12	5	3,17	1,74
	Fosfomanomutasa /fosfoglucomutasa	<i>algC</i>	PA5322	70,75	9,1	4	2	3,15	1,73
	Probable isla de secreción Hcp (HSI-I), sistema de secreción tipo VI	<i>taqQ1</i>	PA0070	46,60	6,9	2	2	2,72	1,52
	Proteína hcp1 componente del sistema de secreción tipo VI (citotoxina secretada)	<i>hcp1</i>	PA0085	47,93	19,1	3	2	1,95	1,04

% Cob. porcentaje de cobertura de la proteína

# Pept. número de péptidos identificados

# (L/H) péptidos empleados para la cuantificación

Prom. promedio de los péptidos cuantificados (PAO1 ↓Pi/ PAO1 ↑Pi)



**Tabla suplementaria 2. Listado de proteínas que disminuyen su expresión en *P. aeruginosa* PAO1 silvestre crecida en carencia de fosfato con respecto a la condición de exceso de fosfato. Se muestran sólo las proteínas que pertenecen a las categorías funcionales de proteínas de transporte, transcripción, modificaciones postraduccionales, degradación de proteínas y chaperonas, biogénesis de pared celular/membrana/envoltura, motilidad celular y secreción, adaptación a condiciones atípicas y factores de virulencia.**

Disminución de la expresión en ↓Pi en comparación con ↑Pi									
Categoría	Proteína	Gen	ORF	Puntuación	% Cob.	# Pépt.	# (L/H)	Prom.	log <sub>2</sub> (Prom -mediana)
<b>METABOLISMO</b>									
Proteínas de transporte	Receptor de hemo/hemoglobina de membrana externa	<i>phuR</i>	PA4710	130,51	20,7	16	12	0,29	-1,71
	Porina de dipeptido glicina-glutamato OpdP	<i>opdP</i>	PA4501	74,98	6,6	3	3	0,30	-1,66
	Transportador ABC		PA4223	98,12	15,6	8	6	0,31	-1,62
	Probable proteína no caracterizada		PA2349	45,18	4,9	4	2	0,39	-1,28
	Probable proteína de membrana externa		PA2760	435,06	24,0	23	15	0,42	-1,18
	Metaioproteinasa de membrana externa de rompimiento de insulina	<i>icmP</i>	PA4970	461,04	31,6	31	20	0,50	-0,926
	Probable receptor dependiente de TonB		PA3268	41,06	6,0	4	2	0,51	-0,897
	Porina de membrana externa inducible anaeróbicamente	<i>oprE</i>	PA0291	80,77	10,7	5	3	0,56	-0,763
	OprE								
	Porina D	<i>oprD</i>	PA0958	941,94	21,4	18	10	0,57	-0,737
<b>ALMACENAJE Y PROCESAMIENTO DE INFORMACIÓN</b>									
Transcripción	Probable regulador transcripcional		PA1283	44,27	17,7	4	3	0,44	-1,110
<b>PROCESOS CELULARES Y SEÑALIZACIÓN</b>									
Modificaciones postraduccionales, degradación de proteínas, chaperonas	10 kDa chaperonina	<i>groES</i>	PA4386	204,92	57,7	16	7	0,59	-0,687
Biogénesis de pared celular									



/ membrana / envoltura									
Motilidad celular y secreción	Probable transductor de quimiotaxis		PA2920	87,29	8,3	4	2	0,59	-0,687
Adaptación a condiciones atípicas	Proteína de unión a ATP y transportador ABC de aminoácidos (transporte de ectoína)		PA1339	69,11	9,8	4	2	0,48	-0,985
Factores de virulencia	Segundo receptor de pioverdina férrica FpvB	<i>fpvB</i>	PA4168	55,90	2,9	3	3	0,20	-2,248
	Proteína de biosíntesis de pioquelina PchD	<i>pchD</i>	PA4228	64,65	4,9	3	2	0,21	-2,178
	Receptor de Fe(3+)-pioquelina	<i>fptA</i>	PA4221	344,45	26,5	23	15	0,29	-1,712
	Probable componente de unión a ATP de transportador ABC		PA4222	55,29	9,8	4	3	0,31	-1,616
	Receptor de ferrioverdina	<i>fpvA</i>	PA2398	137,39	8,8	7	4	0,50	-0,926
	Probable metiltransferasa específica a fenazinas	<i>phzM</i>	PA4209	42,64	8,7	5	3	0,62	-0,616

% Cob. porcentaje de cobertura de la proteína

# Pept. número de péptidos identificados

# (L/H) péptidos empleados para la cuantificación

Prom. promedio de los péptidos cuantificados (PAO1 ↓Pi/ PAO1 ↑Pi)

**Tabla 3. Listado de proteínas que aumentan su expresión en los mutantes de síntesis de los poliP en carencia de fosfato con respecto a la cepa PAO1 silvestre en la misma condición, en los análisis de proteómica cuantitativa.** Se muestran sólo las proteínas que pertenecen a las categorías funcionales de proteínas de transporte, transcripción, modificaciones postraduccionales, degradación de proteínas y chaperonas, biogénesis de pared celular/membrana/envoltura, motilidad celular y secreción, adaptación a condiciones atípicas y factores de virulencia.

Aumento de la expresión en comparación con PAO1 ↓Pi silvestre										
Categoría	Proteína	Gen	ORF	Puntuación	% Cov.	# Pépt.	# (H/L)	Prom.	log <sub>2</sub> (Prom-mediana)	Mutante
<b>METABOLISMO</b>										
Proteínas de transporte	Transportador ABC		PA4223	138,68	11,8	4	4	9,46	2,43	<i>ppk1</i>
	Receptor de hemo/hemoglobina de membrana externa PhuR	<i>phuR</i>	PA4710	95,19	9,7	11	5	8,49	2,27	<i>ppk1</i>



	Proteína de unión a ATP e importación de sulfato/tiosulfato o CysA	<i>cysA</i>	PA0280	121,03	10,3	4	4	5,32	1,60	<i>ppk1</i>
	Porina D	<i>oprD</i>	PA0958	322,07	21,4	14	10	5,27	1,58	<i>ppk1</i>
	Porina de membrana externa inducible anaeróbicamente OprE	<i>oprE</i>	PA0291	108,13	11,3	4	4	4,82	1,45	<i>ppk1</i>
	Transportador de eflujo de multigases RND MexF	<i>maxF</i>	PA2494	55,49	5,5	7	3	4,40	1,32	<i>ppk1</i>
	Probable proteína de membrana externa		PA2760	125,82	14,1	8	6	3,14	0,84	<i>ppk1</i>
	Probable receptor dependiente de TonB		PA3268	66,49	4,2	2	2	3,03	0,78	<i>ppk1</i>
	Transportador ABC		PA4223	167,51	20,4	14	11	3,78	2,07	<i>ppk2</i>
	Porina D	<i>oprD</i>	PA0958	367,84	20,8	21	18	2,22	1,30	<i>ppk2</i>
	Probable componente de unión a ATP de transportador ABC (transporte de ectoína)		PA5152	56,95	7,4	2	2	2,08	1,21	<i>ppk2</i>
	Permeasa de unión a ATP y exportación de lípido A MsbA	<i>msbA</i>	PA4997	122,30	9,1	5	2	1,59	0,82	<i>ppk2</i>
	Proteína G de biosíntesis de glucanos		PA5078	43,28	5,7	4	2	1,43	0,67	<i>ppk2</i>

#### ALMACENAJE Y PROCESAMIENTO DE INFORMACIÓN

Transcrip- ción	Regulador transcripcional MvaT, subunidad P16	<i>mvaT</i>	PA4315	57,50	41,1	12	8	3,18	0,85	<i>ppk1</i>
	Regulador transcripcional MvaT, subunidad P16	<i>mvaT</i>	PA4315	811,97	47,6	32	10	3,51	1,96	<i>ppk2</i>
	Probable regulador de respuesta de dos componentes (PhoB)		PA3346	86,07	8,1	7	2	1,51	0,75	<i>ppk2</i>



PROCESOS CELULARES Y SEÑALIZACIÓN										
Modificaciones postraduccionales, degradación de proteínas, chaperonas	Probable proteasa dependiente de ATP	PA0779	44,40	8,8	10	4	6,47	1,88	<i>ppk1</i>	
	Proteasa Clp dependiente de ATP subunidad proteolítica 2	PA3326	70,96	13,9	5	5	4,66	1,40	<i>ppk1</i>	
	Proteína <i>grpE</i>	<i>grpE</i> PA4762	55,18	21,0	2	2	3,72	1,08	<i>ppk1</i>	
	Proteasa dependiente de ATP, subunidad ATPasa HslU	<i>hslU</i> PA5054	47,14	13,4	6	3	3,71	1,08	<i>ppk1</i>	
	Proteína Hfq	<i>hfq</i> PA4944	60,97	31,7	3	3	3,39	0,95	<i>ppk1</i>	
	Subunidad de proteasa HflK	<i>hflK</i> PA4942	91,92	10,5	6	4	3,33	0,92	<i>ppk1</i>	
	Clp proteasa dependiente de ATP, subunidad proteolítica 2	PA3326	155,31	28,9	9	7	1,89	1,07	<i>ppk2</i>	
Biogénesis de pared celular /membrana /envoltura	Lipotoxin F, LptF	<i>lptF</i> PA3692	255,47	44,1	20	11	4,48	1,35	<i>ppk1</i>	
	Tetrahidrodipicolinato N-succiniltransferasa	<i>dapD</i> PA3666	51,28	15,4	3	2	3,33	0,92	<i>ppk1</i>	
	Regulador del largo de cadena de antígeno O	<i>wzz</i> PA3160	74,40	21,6	8	2	3,19	0,86	<i>ppk1</i>	
	Probable proteína no caracterizada	PA4925	103,89	11,3	3	2	2,96	0,75	<i>ppk1</i>	
	Probable proteína no caracterizada	PA1053	93,64	21,4	4	4	2,81	0,67	<i>ppk1</i>	
	Tetrahidrodipicolinato N-succiniltransferasa	<i>dapD</i> PA3666	75,95	3,5	2	2	1,40	0,64	<i>ppk2</i>	
	Similar a UDP-glucosa/ GDP-manosa deshidrogenasa	<i>wbpA</i> PA3159	55,11	7,8	4	2	1,38	0,62	<i>ppk2</i>	
Motilidad celular y secreción	Proteína de motilidad FimV	<i>fimV</i> PA3115	55,92	4,6	8	2	5,01	1,51	<i>ppk1</i>	
	Peptidoglicano hidrolasa <i>flgJ</i>	<i>flgJ</i> PA1085	42,09	14,8	6	3	16,81	3,28	<i>ppk1</i>	
	Proteína de ensamblaje de fibras tipo 4 PIC	<i>pilC</i> PA4527	54,54	17,4	4	2	3,21	0,87	<i>ppk1</i>	
	Proteína de fimbrias	<i>pilA</i> PA4525	56,72	48,3	6	4	2,72	0,63	<i>ppk1</i>	
	Uricasa PuuD (T6SS)	PA2366	283,43	21,9	12	11	4,56	2,34	<i>ppk2</i>	



	Probable proteína no caracterizada (T6SS)	PA2985	54,32	25,4	7	5	3,87	2,10	<i>ppk2</i>
	Proteína de ensamblaje de fimbrias piliQ	<i>pilQ</i> PA5040	62,30	12,7	6	3	1,53	0,77	<i>ppk2</i>
Adaptación a condiciones atípicas	Probable regulador híbrido sensor/respuesta	PA4112	65,16	4,2	6	2	1,60	0,83	<i>ppk2</i>
	Probable proteína del sistema de restricción-modificación	PA2735	44,35	3,9	3	2	1,69	0,91	<i>ppk2</i>
Factores de virulencia	Receptor de Fe(3+)-pioquelina	<i>fptA</i> PA4221	399,66	35,8	21	17	13,66	2,96	<i>ppk1</i>
	Probable componente de unión a ATP de transportador ABC	PA4222	61,69	8,2	6	5	7,52	2,10	<i>ppk1</i>
	Sintetasa de ácido dihidro-aeruginoso	<i>pchE</i> PA4226	66,02	2,2	3	2	5,58	1,66	<i>ppk1</i>
	Receptor de ferrosideróforos de tipo hidroxamato	PA4514	60,13	4,5	2	2	3,96	1,17	<i>ppk1</i>
	MucD	<i>mucD</i> PA0766	67,11	5,5	4	3	3,75	1,09	<i>ppk1</i>
	Sintetasa de ácido dihidro-aeruginoso	<i>pchE</i> PA4226	91,21	3,8	3	3	5,30	2,56	<i>ppk2</i>
	Receptor de Fe(3+)-pioquelina	<i>fptA</i> PA4221	239,11	16,4	16	12	3,39	1,91	<i>ppk2</i>
	Pioquelina sintetasa	<i>pchF</i> PA4225	108,82	4,4	7	5	2,88	1,68	<i>ppk2</i>
	Probable componente de unión a ATP de transportador ABC	PA4222	106,61	11,5	11	8	2,88	1,68	<i>ppk2</i>
	Proteína G de la vía general de secreción (T2SS)	<i>xcpT</i> PA3101	62,86	33,1	5	3	2,40	1,42	<i>ppk2</i>
	Transportador de sideróforos AmpP (familia RhtX/FptX)	<i>ampP</i> PA4218	77,71	3,6	2	2	1,76	0,97	<i>ppk2</i>
	Factor sigma-H de ARN polimerasa	<i>algU</i> PA0762	61,74	7,8	5	2	1,48	0,72	<i>ppk2</i>
	MucD	<i>mucD</i> PA0766	152,60	10,3	10	6	1,47	0,71	<i>ppk2</i>
	PvdL	<i>pvdL</i> PA2424	52,37	1,7	8	4	1,41	0,65	<i>ppk2</i>

% Cob. porcentaje de cobertura de la proteína

# Pept. número de péptidos identificados

# (L/H) péptidos empleados para la cuantificación

Prom. promedio de los péptidos cuantificados (PAO1 ↓Pi/ PAO1 ↑Pi)



**Tabla 4. Listado de proteínas que disminuyen su expresión en los mutantes de síntesis de los poliP en carencia de fosfato con respecto a la cepa PAO1 silvestre en la misma condición, en los análisis de proteómica cuantitativa.** Se muestran sólo las proteínas que pertenecen a las categorías funcionales de proteínas de transporte, transcripción, modificaciones postraduccionales, degradación de proteínas y chaperonas, biogénesis de pared celular/membrana/envoltura, motilidad celular y secreción, adaptación a condiciones atípicas y factores de virulencia.

Disminución de la expresión en comparación con PAO1 ↓Pi silvestre										
Categoría	Proteína	Gen	ORF	Puntuación	% Cov.	# Pépt.	# (H/L)	Prom.	log <sub>2</sub> (Prom-mediana)	Mutante
<b>METABOLISMO</b>										
Proteínas de transporte	Proteína de membrana externa de flujo de multidrogas OprN	<i>oprN</i>	PA2495	56,42	5,3	2	2	0,11	-3,99	<i>ppk1</i>
	Proteína de membrana externa H1	<i>oprH</i>	PA1178	184,44	44,0	6	3	0,63	-1,48	<i>ppk1</i>
	Probable componente de unión a ATP de transportador ABC		PA4595	61,12	14,1	6	3	0,70	-1,33	<i>ppk1</i>
	Porina O	<i>oprO</i>	PA3260	749,93	39,0	45	34	0,75	-1,23	<i>ppk1</i>
	Componente de transmembrana del complejo de transporte específico de fosfato	<i>pstC</i>	PA5366	55,46	4,6	3	2	1,06	-0,70	<i>ppk1</i>
	Proteína de membrana externa de flujo de multidrogas OprN	<i>oprN</i>	PA2495	242,90	28,0	10	9	0,15	-2,56	<i>ppk2</i>
	Proteína de membrana externa H1	<i>oprH</i>	PA1178	242,99	47,5	12	8	0,35	-1,36	<i>ppk2</i>
	Transportador de flujo de multidrogas de fusión de membrana RND MexE	<i>mexE</i>	PA2493	138,09	17,1	9	7	0,36	-1,32	<i>ppk2</i>
	Proteína reguladora del sistema de transporte de fosfato PhoU	<i>phoU</i>	PA5365	47,09	14,9	3	3	0,54	-0,74	<i>ppk2</i>



	Transportador de flujo de multidrogas	<i>maxF</i>	PA2454	40,49	4,9	4	2	0,54	-0,74	<i>ppk2</i>
	RND MexF									
	Porina O	<i>oprO</i>	PA3280	2225,08	51,8	144	89	0,56	-0,68	<i>ppk2</i>
	Proteína de membrana externa	<i>oprM</i>	PA0427	191,87	20,6	8	7	0,57	-0,60	<i>ppk2</i>
<b>ALMACENAJE Y PROCESAMIENTO DE INFORMACIÓN</b>										
Transcripción	Probable proteína no caracterizada (proteína A de choque de fagos)		PA3731	76,37	14,3	4	2	0,09	-3,32	<i>ppk2</i>
<b>PROCESOS CELULARES Y SEÑALIZACIÓN</b>										
Modificaciones postraduccionales, degradación de proteínas, chaperonas	Probable tiol peroxidasa	<i>tpx</i>	PA2532	75,03	27,3	3	2	0,66	-1,42	<i>ppk1</i>
	Probable CipA/B proteasa, subunidad de unión a ATP		PA0459	208,24	20,1	18	12	1,03	-0,77	<i>ppk1</i>
	Chaperona dnaJ	<i>dnaJ</i>	PA4760	108,24	7,7	8	4	1,08	-0,70	<i>ppk1</i>
	Probable proteasa		PA1327	198,75	10,7	11	7	1,13	-0,64	<i>ppk1</i>
	Probable CipA/B proteasa, subunidad de unión a ATP		PA0459	659,15	26,1	30	20	0,55	-0,71	<i>ppk2</i>
Biogénesis de pared celular /membrana /envoltura	Lípido A 3-O-deacilasa	<i>pagL</i>	PA4661	71,80	14,5	4	3	1,08	-0,70	<i>ppk1</i>
	Probable proteína no caracterizada		PA1053	126,99	27,3	5	4	0,48	-0,91	<i>ppk2</i>
	UDP-2-acetamido-2-dideoxi-d-ribohex-3-ácido ulurónico transaminasa, WbpE	<i>wbpE</i>	PA3155	48,72	9,7	2	2	0,49	-0,88	<i>ppk2</i>
	2-dehidro-3-deoxifosfooctonato aldolasa	<i>kdsA</i>	PA3636	71,63	21,4	9	6	0,50	-0,85	<i>ppk2</i>
	Lípido A 3-O-deacilasa	<i>pagL</i>	PA4661	313,95	54,3	15	10	0,53	-0,76	<i>ppk2</i>
	Regulador del largo de cadena de antígeno O	<i>wzz</i>	PA3160	42,07	10,6	3	3	0,54	-0,74	<i>ppk2</i>
Motilidad celular y secreción	Lactina de unión a lucosa PA-III	<i>lcbB</i>	PA3361	59,28	11,3	2	2	0,52	-1,76	<i>ppk1</i>
	CheA	<i>cheA</i>	PA1459	61,39	8,4	6	2	0,92	-0,94	<i>ppk1</i>
	Probable proteína de estrés de unión a ADN		PA0962	55,36	19,2	3	3	0,63	-1,48	<i>ppk1</i>
	Catalasa	<i>katA</i>	PA4236	328,01	24,3	15	10	0,74	-1,25	<i>ppk1</i>
	Probable peroxidasa		PA3529	97,99	28,0	11	5	0,75	-1,23	<i>ppk1</i>



Adaptación a condiciones atípicas	Alquil hidropéroxido reductasa, subunidad C	<i>ahpC</i> PA0139	170,42	29,9	8	6	0,79	-1,16	<i>ppk1</i>
	Alquil hidropéroxido reductasa, subunidad C	<i>ahpC</i> PA0139	214,67	62,6	11	8	0,15	-2,58	<i>ppk2</i>
	Superóxido dismutasa [Fe]	<i>sodB</i> PA4366	53,01	19,7	6	3	0,29	-1,63	<i>ppk2</i>
	Probable peroxidasa	PA3529	267,11	46,5	16	10	0,44	-1,03	<i>ppk2</i>
	Catalasa	<i>katA</i> PA4236	396,06	36,7	20	14	0,45	-1,00	<i>ppk2</i>
	Probable proteína no caracterizada	PA5178	984,48	73,1	55	18	0,53	-0,76	<i>ppk2</i>
Factores de virulencia	Probable dipeptidasa (síntesis de pioverdina)	PA2393	91,81	6,7	3	2	0,05	-5,14	<i>ppk1</i>
	PvdF	<i>pvdF</i> PA2396	46,02	5,1	2	2	0,30	-2,55	<i>ppk1</i>
	Proteína hcp1	<i>hcp1</i> PA0085	115,26	34,6	5	3	0,79	-1,16	<i>ppk1</i>
	Fosfomanomutasa /fosfoglucosutasa	<i>algC</i> PA5322	43,70	5,2	4	2	1,09	-0,69	<i>ppk1</i>
	Proteína Hcp1	<i>hcp1</i> PA0085	160,27	24,7	4	2	0,37	-1,28	<i>ppk2</i>

% Cob. porcentaje de cobertura de la proteína

# Pept. número de péptidos identificados

# (L/H) péptidos empleados para la cuantificación

Prom. promedio de los péptidos cuantificados (PAO1 ↓Pi/ PAO1 ↑Pi)



Figura suplementaria 1. Resultados cinéticos de todos los microarreglos fenotípicos analizados para la comparación entre el mutante *ppk1* y la cepa silvestre.

Consenso: PAO1 *ppk1* (verde) versus PAO1 silvestre (rojo)

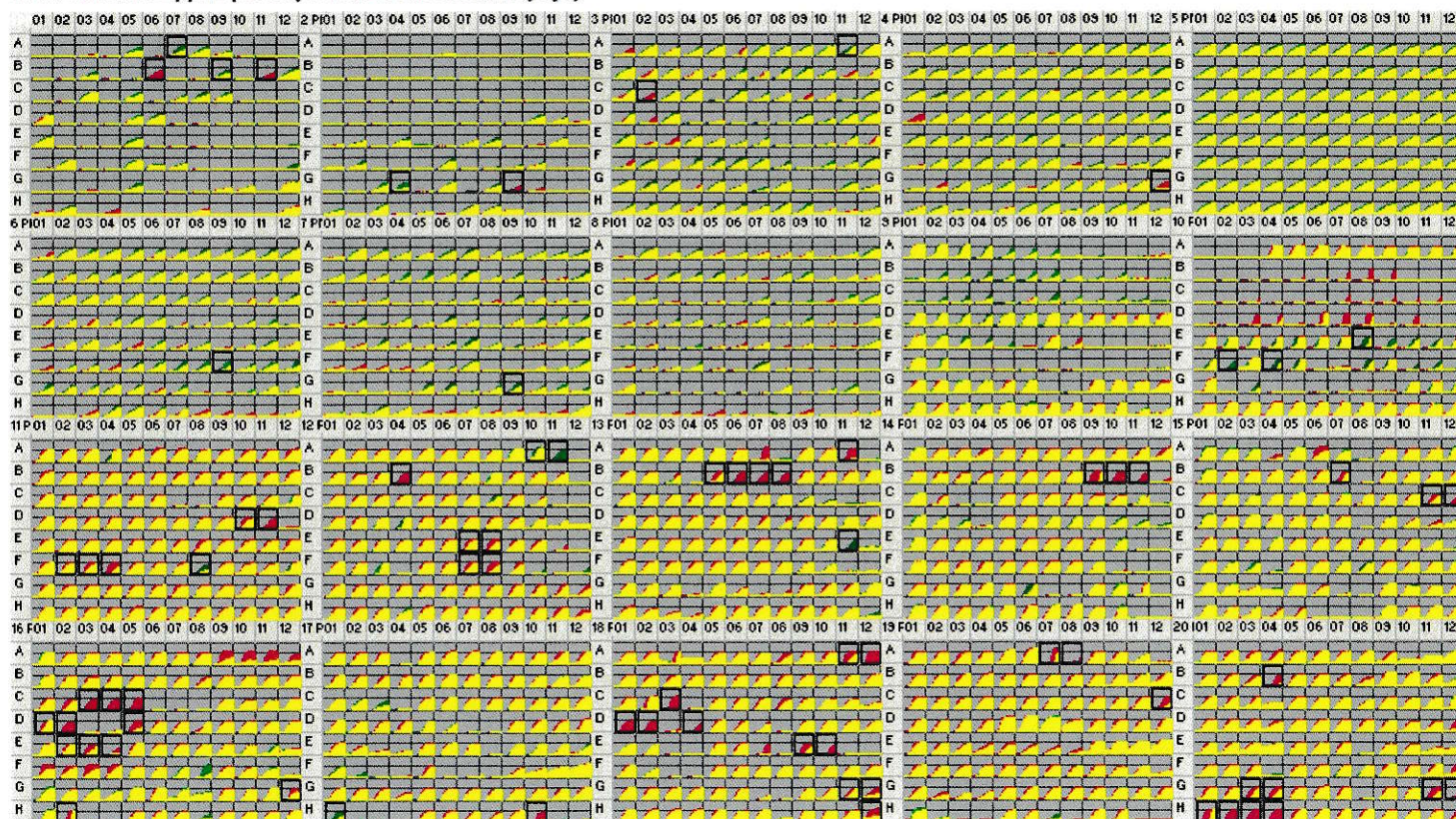




Figura suplementaria 2. Resultados cinéticos de todos los microarreglos fenotípicos analizados para la comparación entre el mutante *ppk2* y la cepa silvestre.

Consenso: PAO1 *ppk2* (verde) versus PAO1 silvestre (rojo)

